

DIE INVLOED VAN DRUIFFENOLE OP  
ALKOHOLIESE GISTING

deur



H.A. Sieberhagen

Skripsie ingelewer vir die graad van Magister  
in Natuurwetenskappe in Landbou aan die  
Universiteit van Stellenbosch

STELLENBOSCH,  
Maart 1970.

### DANKBETUIGING

Die skrywer wil graag sy opregte dank uitspreek teenoor die volgende persone en instansies:

Prof. dr. C.J. van Wyk van die Departement Wynkunde van die Universiteit van Stellenbosch, vir sy belangstelling en leiding tydens die uitvoering van die ondersoek en voorbereiding van die skripsie.

Die Direkteur en personeel van die Navorsingsinstituut vir Wynkunde en Wingerdbou vir daadwerklike hulp verleen.

Die Departement van Landbou-Tegniese Dienste vir goedkeuring om die resultate van navorsing wat in hul diens onderneem is, vir skripsiedoeleindes te gebruik.

---

INHOUDBladsy

HOOFSTUK 1	<u>INLEIDING</u>	1
HOOFSTUK 2	<u>MATERIAAL EN METODES</u>	
	2.1 Materiaal .....	8
	2.2 Metodes .....	9
	2.2.1 Bereiding van wyne vanaf cultivars ..	9
	2.2.2 Ontledingsmetodes .....	10
	2.2.3 Behandeling van wyn en persmos met PVP .....	11
	2.2.4 Chromatografiese fraksionering van wynfenole .....	11
	2.2.5 Bepaling van gistingsnelheid en gis- tingsdoeltreffendheid .....	17
	2.2.6 Voorbereiding van gisselsuspensies ..	22
	2.2.7 Bepaling van gisselvermeerdering m.b.v. die toetsskyfie-metode ....	23
	2.2.8 Ekstrahering van druifdop en -pit fenole .....	24
	2.2.9 Bepaling van gisselvermeerdering onder aerobiese toestande .....	25
	2.2.10 Bepaling van gisselvermeerdering onder anaerobiese toestande .....	26
	2.2.11 Gisseltellings .....	27
HOOFSTUK 3	<u>RESULTATE EN BESPREKING</u>	
	3.1 Die invloed van druifdoppe, -pitte en -stingels van verskillende cultivars op die gistingsproses .....	28
	3.2 Die invloed van PVP-behandelings op die gisting van persmos en die her- gisting van wyn .....	31

3.3	Die invloed van gefraksioneerde wynfenole op die gistingsnel- heid en vermeerdering van gis- selle .....	34
3.3.1	Invloed op gistingsnelheid .....	35
3.3.2	Invloed op gisselvermeerdering ..	36
3.4	Invloed van dop- en pitekstrakte op gisting, vermeerdering en fisiologiese toestand van gis- selle .....	37
3.4.1	Invloed op verloop van gisting ..	38
3.4.2	Invloed op fisiologiese toestand van gisselle .....	39
3.4.3	Invloed op gisselvermeerdering onder aerobiese toestande ....	42
3.4.4	Invloed op gisselvermeerdering onder anaerobiese toestande ..	43
HOOFSTUK 4	<u>GEVOLGTREKKINGS</u>	45
	<u>LITERATUURVERWYSINGS</u>	47

---

## HOOFSTUK 1

### INLEIDING

By die bereiding van droëwyne is dit wenslik dat alle gisbare suikers in die druiwemos volledig deur die gisselle uitgegis word. Indien die gistingsproses spontaan tot stilstand kom terwyl daar nog noemenswaardige hoeveelhede suiker in die mos teenwoordig is, het die mos bly steek. Suikerreste in 'n droëwyn kan verskeie nadele inhou, waarvan sekondêre mikrobiologiese troebeling in die gebottelde wyn die vernaamste is. Organolepties waarneembare suikerreste is ook vanuit 'n kwaliteitsoogpunt nadelig in 'n droëwyn.

Dit word aanvaar dat alle gisbare suikers in 'n druiwemos uitgegis het sodra die wyn nie meer as ongeveer 0.15 persent suiker bevat nie (Amerine, 1955). In die praktiese wynbedryf word meesal van maatstawwe soos die Ballinglesing wat met behulp van 'n hidrometer bepaal word, of van ekstrakgehalte gebruik gemaak om te bepaal of die suiker volledig uitgegis het. Albei hierdie maatstawwe gee 'n aanduiding van totale opgeloste bestanddele en nie slegs van suikerreste nie. Alhoewel 'n goeie aanduiding van suikergehalte op bogenoemde wyse verkry kan word, is die chemiese bepaling daarvan, die enigste betroubare wyse om moontlike suikerreste in 'n wyn aan te toon.

Verskeie faktore kan verantwoordelik wees vir die aan- of afwesigheid van suikerreste in wyn, byvoorbeeld gistingsvermoë

van die gisras, gistingstemperatuur, aanvanklike suikergehalte van die druiwemos en voedingstowwe in die mos. In die Suid-Afrikaanse wynbedryf word periodiek ondervind dat veral moste wat lank op doppe gegis het, soos wat vereis word in die bereiding van droë rooiwyn, volgens Ballinglesing nie volkome droog gis nie. Veral moste van die cultivar Pontak en persmos afkomstig van hoë-druk perse is tot hierdie verskynsel geneig. Dit skyn dus asof die moontlike inhibisie van die gistingsproses veral voorkom by moste wat 'n hoë konsentrasie van die bestanddele van druifdoppe en -pitte bevat. Hoë konsentrasies fenoliese verbindings kom in genoemde druifkomponente voor (Singleton & Esau, 1969).

Hierdie ondersoek is gedoen om vas te stel of die natuurlike fenoliese verbindings in druiwe 'n inhiberende invloed op die alkoholiese gistingsproses kan uitoefen. Onder natuurlike fenoliese verbindings word saamgevat alle tanniene, flavonoïede, fenoliese sure ens. wat normaalweg in druiwe voorkom. Die moontlikheid dat bogenoemde verbindings die gistingsvermoë van gisselle sodanig kan benadeel dat alle beskikbare suiker nie uitgis nie, is ondersoek.

In 1934 het Europa 'n baie warm jaar ondervind en was die kleurontwikkeling in die rooi druifsoorte baie hoër as normaalweg. In die bereiding van rooiwyne is ook ondervind dat sommige moste nie wou droog gis nie. Flanzky (1935) het gevind dat die gisting van sulke moste tot op 'n sekere stadium bevredi-

gend verloop en dan bly steek het. Later het dié moste weer begin gis en het die gistingsproses meesal volledig verloop. Faktore soos ongunstige temperatuur, te veel suiker, te veel swaweldioksied of 'n voedingstofgebrek kon nie met die verskynsel in verband gebring word nie. Volgens genoemde outeur was dit die hoë konsentrasie kleurstof wat „narkoties” op die gisselle gewerk het en dus die gisting belemmer het. Volgens hom het die gisselle later askospore gevorm wat dan weer kon ontkiem om 'n nuwe geslag gisselle daar te stel. Hierdie nuwe geslag gisselle sou dan teen die hoë konsentrasie kleurstof bestand wees en die gistingsproses voltooi. Genoemde bewerings is egter nie afdoende deur navor-singsresultate bewys nie.

Goldman (1963) het ondersoek ingestel na die faktore wat die ontwikkeling van koolsuurgas gedurende vonkelwyn-bereiding beïnvloed. Hy het o.a. gevind dat rooiwyn onder dieselfde toestande as witwyn, baie stadiger 'n koolsuurgasdruk in die bottel opbou en ook nie so 'n hoë koolsuurgasdruk as laasgenoemde bereik nie. Sy verklaring hiervoor was dat die rooi kleurstowwe die gisselle nadelig kon beïnvloed het.

Joubert (1948) het o.a. die invloed van tannien op die gistingsvermoë van agt Suid-Afrikaanse gisrasse nagegaan. Tannien in konsentrasies so hoog as 5.4 g/l het slegs 'n effens vertra-gende invloed op die gistingsproses gehad, behalwe in die geval van een gisras wat geensins in die teenwoordigheid van so 'n hoë konsentrasie tannien kon gis nie. Die tannien was meer strem-



mend op die gistingsnelheid van die „flor“ giste as die „nie-flor“ giste. Marcilla (volgens Schanderl, 1962) het aangetoon dat tannien die ontwikkeling van die kim in sjerrie-bereiding kan vertraag en die kleur daarvan kan verdonker.

Schanderl (1959) het die invloed van tannien op die gistingsproses ondersoek en het gevind dat in die konsentrasies wat tannien normaalweg in wyn voorkom, dit geen nadelige invloed op die egte wyngiste Saccharomyces cerevisiae gehad het nie. Die tannien het egter 'n uiters stremmende invloed op die gis Kloeckera apiculata gehad. Volgens genoemde outeur word 'n klein byvoeging van tannien by die eerste afloopmos („cuvee“) in die bereiding van champagne juis gemaak om die ontwikkeling van K. apiculata wat uiters ongewens is, te verhoed.

Volgens Schanderl (1962) het sekere fenoliese sure in kombinasie met alkohol die gistingsproses gestrem. Sy verklaring is dat die alkohol die deurlaatbaarheid van die gisselwand verhoog, gevolglik kan die fenoliese sure die sel binnedring en met die proteïene binne die sel reageer.

Sikovec (1966 a, b) het die invloed van 'n paar fenoliese sure op die gistingsverloop, respirasie en selvermeerdering van gisselle in 'n sintetiese medium nagegaan. Die aanvangskonsentrasies van die alkohol in die medium het tussen 0, 6 en 11 volume persent gewissel. By 'n aanvangskonsentrasie van 0 persent alkohol het die fenoliese sure almal tot 'n mate stremmend op die gisting gewerk. By aanvangskonsentrasies van 6 en 11 per-



sent alkohol het isochlorogeensuur die produksie van koolsuurgas redelik bevorder terwyl kafeïenesuur redelik stremmend was. Dit word aangevoer dat bogenoemde verskynsel een van die redes is waarom 'n ou wyn waarvan die isochlorogeensuur reeds tot kafeïenesuur gehidroliseer is, moeiliker as 'n jong wyn 'n tweede gistingsproses sal ondergaan. Verder is bevind dat die betrokke fenoliese sure die selvermeerdering van S. cerevisiae tot 'n mate gestrem het. Respirasie is in die afwesigheid van alkohol gestimuleer en in die aanwesigheid daarvan gestrem.

Lüthi (1957) het probeer vasstel waarom appel- en peerwyne soms moeilik gis, of die suiker net gedeeltelik uitgis en die gisting dan bly steek. Die verwydering van tannien met gelatien het 'n effense verbetering in die gistingsproses tot gevolg gehad. Die vernaamste oorsaak vir die bly-steek van 'n gistingsproses is egter volgens dié outeur 'n tekort aan voedingstowwe in die moste.

Dittrich & Kerner (1966) het gevind dat die alkielesters van gallussuur toksies vir gisselle kan wees. Hoe langer die alkielketting van die gallaat (tot by n-oktielgallaat) hoe meer toksies is die ester. Dit word aangevoer dat die toksiteit van die ester waarskynlik in noue verband met die „vetoplosbaarheid” daarvan staan. Volgens genoemde outeurs kan daar nie 'n letale konsentrasie van die ester binne die sel ontstaan terwyl die gisselle vermeerder nie, aangesien die ester deur die proses van seldeling elke keer „verdun” word. Nadat seldeling opgehou het, sterf die gisselle egter gou as gevolg van die ontstaan van 'n letale kon-

sentrasie ester in die sel.

Enige moontlike inhibisie van gisselle deur fenoliese verbindings kan moontlik in verband gebring word met die feit dat fenoliese verbindings met proteïene deur middel van waterstofbindinge koagulate kan vorm. Die waterstofbindinge ontstaan tussen die hidroksielgroepe van die fenoliese verbinding en die peptiedbande in die proteïen (Gustawson, volgens Haslam, 1966). Hoewel dit wil voorkom asof die effek van fenoliese verbindings op gisselle primêr op genoemde reaksie berus, is daar egter nog nie helderheid aangaande die presiese lokaliteit van inhibisie nie en derhalwe ook nie omtrent die wyse waarop gisselle benadeel kan word nie.

Daar bestaan eerstens die moontlikheid dat fenoliese verbindings as gevolg van die reaksie daarvan met proteïene in die gisselwand, daarop aanpak en sodoende die fisiologiese aktiwiteit van die gissel belemmer. Hierdie meganisme van inhibisie word as verklaring aangebied in baie gevalle waar gevind is dat fenoliese verbindings wel die ontwikkeling van mikro-organismes kan inhibeer, (Oka, volgens Singleton & Esau, 1969). Die moontlikheid is dus nie uitgesluit dat as gevolg van 'n geleidelike verswakking in hul fisiologiese toestand die gisselle teen die einde van die gistingsproses nie genoeg lewenskragtigheid besit om die suiker volledig uit te gis nie.

'n Tweede moontlikheid is meer spesifiek die inhibisie van ensieme deur fenoliese verbindings. Die aanduiding is dat fenoliese verbindings 'n minimum molekulêrgewig van ongeveer 500

moet besit om as inhibeerders van ensieme op te tree (Williams, 1963). Boser (1961) het die invloed van verskeie flavonoïede op drie biologiese dehidrogenase ensiemsisteme in vitro bestudeer. Sommige van die flavonoïede was instaat om ensiemwerking te inhibeer. Die inhiberende werking van die flavonoïede kon egter in die meeste gevalle sterk verminder word deur die byvoeging van nie-ensiem proteïen. Hulme & Jones (1963) vind dat die suksienoksidase-aktiwiteit in die mitochondria van appels verhoog word deur die byvoeging van polivinielpirrolidone (PVP). Die PVP presipiteer die tanniene wat die ensiemaktiwiteit inhibeer. Die hoë weerstand wat sommige appelsoorte teen die bruinvrot-siekte het, word toegeskryf aan hoë tanniengehalte. Cole (1958) het bevind dat die pektolitiese ensieme van die siekteveroorsakende swam deur hoë molekulêrgewig flavanole geïnaktiveer word. Indien fenoliese verbindings as inhibeerders van ensieme in gisselle sou optree, moet die molekulêre grootte van die verbindings toelaat dat dit deur die gisselwand kan dring, tensy polimerisasie van lae molekulêrgewig verbindings binne die sel kan plaasvind.

Uit die genoemde ondersoeke blyk dat tevore hoofsaaklik die invloed van tannien, waarvan die oorsprong of samestelling nie altyd vermeld word nie en rein fenoliese sure op gisselle ondersoek is. Dit is vanselfsprekend dat resultate wat vir tannien of rein fenoliese sure geld, nie noodwendig as maatstaf kan dien van die invloed wat die komplekse mengsel van fenoliese verbindings van druiwe op gisselle sal uitoefen nie.

## HOOFSTUK 2

### MATERIAAL EN METODES

#### 2.1 Materiaal

2.1.1 Ten einde die invloed van cultivar op die volledigheid van die gistingsproses te ondersoek, is wyne in die 1967 oesjaar vanaf die cultivars Steen, Pontak, Shiraz en Hermitage berei. Die Shiraz, waarvan die mos na bewering in sommige jare moeilik droog gegis het, was afkomstig van 'n wingerd naby Durbanville. Die ander cultivars was afkomstig van die Elsenburgse wingerde van die Stellenbosch-Elsenburg-Landboukollege. Die suikergehaltes van die druiwe word in Tabel 1 weergegee.

2.1.2 Pontakwyne afkomstig van die eksperiment met cultivars, asook Steen persmos (9° Balling) afkomstig van 'n kommersiële kontinueerlike pers is gebruik in gistingsproewe waar fenoliese verbindings deur polivinielpirrolidoon verwyder is. Die keuse van 'n persmos as gistingsmedium ryk aan fenoliese verbindings, is gedoen omdat probleme met soortgelyke moste ondervind is in soverre dat die gisting skynbaar op 'n suikergehalte van 2° Balling bly steek het.

2.1.3 As bron van fenoliese verbindings vir die chromatografiese fraksionering daarvan, is Pontakwyn en perswyn in die laboratorium berei. Vir dié doel is Pontakdruiwe (25° Balling) en persmos van dieselfde oorsprong as in 2.1.1 en 2.1.2 onderskeidelik, vir ongeveer vier maande by -10°C opgeberg.



2.1.4 Vir die bereiding van groot hoeveelhede dop-en pitekstrakte is Pontakdruie (24° Balling) van die 1969 oesjaar, afkomstig vanaf die Elsenburgse wingerde, gebruik. Die druie is vir ongeveer vier maande by -10°C opgeberg. Slegs gesonde korrels is gebruik vir die herwinning van doppe en pitte. Die doppe is met die hand afgetrek en deeglik onder lopende kraanwater gewas om die vlesige gedeeltes, asook suikerbevattende sap te verwyder. Die pitte is op soortgelyke wyse gewas. Altesaam 1800g doppe en 520g pitte is versamel.

## 2.2 Metodes

### 2.2.1 Bereiding van wyne vanaf cultivars.

Die druie van elke cultivar is trosgewyse gelykkansig tussen die onderskeie behandelings verdeel. Veertien kg druie vir elke behandeling is met die hand stukkend gedruk en die stingels verwyder waar nodig. Waar die mos van die doppe en pitte geskei moes word, is van 'n geperforeerde plastiese emmer gebruik gemaak en die afloopmos in 'n 10 l glaskan oorgebring. Waar die mos in teenwoordigheid van soliede druifmateriaal gegis het, het die gisting in 3 gel. plastiese emmers plaasgevind. Ten einde doeltreffende ekstrahering van die doppe te verseker, is die koek doppe elke vier tot ses uur deeglik deurgedruk. Nadat 10° Balling uitgegis het, is die doppe gepers in 'n laboratorium-model hidrouliese pers en die aftrek- en persmos in 'n 10 l glaskan verder gegis. Swaweldioksied is in die vorm van kaliummetabisulfaat direk na die pers van die druie toegedien. Vryafloop mos het 100 d.p.m. swawel-



dioksied ontvang. Waar mos in teenwoordigheid van die soliede druifmateriaal gegis het, het die geparste druiwe 2.0g kaliummetabisulfië per 14 kg druiwe ontvang, d.w.s. die mos het hier ook ongeveer 100 d.p.m. swaweldioksied ontvang. Al die monsters is teen 2 persent (v/v) ingeënt met 'n aktiefgistende kultuur van Saccharomyces cerevisiae var. ellipsoideus (ras W.E. 1 van die Navorsingsinstituut vir Winkunde en Wingerdbou).

Tydens die gistingsproses is daaglik Ballinglesings van die moste geneem. Agt dae na afloop van die gisting is die eerste oortap gegee. Die wyn is van die gismoer oorgehewel in 'n een gelling glaskan. Voldoende opvulwyn is in glasbottels gehou. Twee weke na die eerste oortap is die tweede oortap gegee en terselfdertyd is 25 d.p.m. swaweldioksied by die wyn gevoeg. Ongeveer een maand na die tweede oortap was die wyne redelik blink en is dit gebottel en vir reduserende suiker-, gliserol-, alkohol- en totale fenolgehalte ontleed.

## 2.2.2 Ontledingsmetodes

### 2.2.2.1 Reduserende suikers.

Die reduserende suikergehalte is bepaal volgens die metode van Lane en Eynon (Amerine, 1955).

### 2.2.2.2 Totale fenolgehalte.

Die totale fenolgehalte is met behulp van die Folin-Ciocalteus reagens bepaal (Singleton & Rossi, 1965).

### 2.2.2.3 Gliserol.

Gliserol is volgens die metode van Neish (1952) bepaal.

### 2.2.2.4 Alkohol.

Die alkoholgehaltes is met behulp van 'n refraktometer op die wyndistillate bepaal (A.O.A.C, 1965).

### 2.2.3 Behandeling van wyn en persmos met PVP.

Van elke Pontakwyn (2.1.2) is 400 ml. onder vakuum by 32°C tot ongeveer 100 ml. ingedamp. Die ekstrakte is vervolgens met gedistilleerde water tot op die oorspronklike volume verdun. Hierdie prosedure is gevolg teneinde die alkohol te verwyder. Een helfte (200 ml) van elke alkoholvrye wyn is daarna met PVP behandel deur dit met 5 g. PVP vir twee uur te skud, waarna laasgenoemde deur sentrifugering verwyder is. Die ander helfte van elke wyn is sonder PVP vir twee uur geskud en daarna gesentrifugeer. Hierna het alle monsters 'n toevoeging van 10 persent glukose ontvang. Die verwydering van alkohol en toevoeging van glukose is gedoen om die wyne vir 'n tweede gistingproses voor te berei.

Drie hoeveelhede persmos (2.1.2) van 800 ml. elk is ook onderskeidelik met 0g, 25g en 50g PVP vir twee uur geskud, waarna die PVP deur sentrifugering verwyder is.

### 2.2.4 Chromatografiese fraksionering van wynfenole.

Om met sekerheid die invloed van slegs fenoliese verbindings op gisting vas te stel, is dit nodig om genoemde verbindings



afsonderlik van ander druif- of wynbestanddele te verkry. Die behoefte het dus ontstaan om individuele of ten minste groepe van verwante verbindings, redelik suiwer deur herwinning uit wyn en daaropvolgende fraksionering te verkry.

#### 2.2.4.1 Bereiding van wyne.

Pontakwyn is in die laboratorium berei deur ongeveer 7 kg druiwe (2.1.3) te pars en die mos op die doppe, pitte en stingels te laat gis. Swaweldioksied (100 d.p.m.) en 2 persent (v/v) reingis (gisras W.E. 1) is toegedien. Die koek doppe is gereeld deurgedruk om 'n hoë konsentrasie fenoliese verbindings in die wyn te verseker. Die mos is toegelaat om op die doppe droog te gis voordat die doppe gepers is in 'n laboratorium-model hidrouliese pers. Die persmos is by die aftrekmos gevoeg. Hierdie wyn het 'n konsentrasie fenoliese verbindings van 3.6 g/l gallussuur ekwivalente gehad.

Van die wit persmos (2.1.3) is 2 l met 2 persent (v/v) van 'n suspensie van gisras W.E.1 ingeënt en toegelaat om uit te gis. Hierdie perswyn het 'n konsentrasie fenoliese verbindings van 4.2 g/l gallussuur ekwivalente gehad.

Albei wyne is steriel filtreer voor verdere behandeling.

#### 2.2.4.2 Herwinning van fenoliese verbindings uit wyn.

Om van die meeste nie-fenoliese wyn bestanddele ontslae te raak, is van presipitasie van fenoliese verbindings met loodasetaat gebruik gemaak. Gedeeltelike fraksionele presipitasie van fenoliese verbindings met loodasetaat by verskillende pH-

waardes is deur Vuataz, Brandenberger & Egli (1959) en Vuataz & Brandenberger (1961) toegepas. Teneinde die pH vir volledige presipitasie van wynfenole te bepaal, is 'n voorproef met die Pontakwyn gedoen. Daaruit het geblyk dat indien versadigde loodasetaatoplossing in 'n verhouding van 1:1 by wyn gevoeg word, en die pH van die bostaande vloeistof tot by pH10 verhoog word, die herwinning van totale fenole 98 persent was, terwyl dit by pH8.5 slegs 88 persent was.

Derhalwe is 200 ml versadigde basiese loodasetaat tot 200 ml van elke wyn gevoeg en die pH van die mengsel met N NaOH tot pH 10.0 verhoog. Die neerslag is deur sentrifugering herwin, eenmaal met versadigde loodasetaat-oplossing by pH 10.0 gewas en weer gesentrifugeer. Met N HCl is die fenoliese verbindings uit die neerslag vrygestel en die gevormde loodchloried afgesentrifugeer. In 'n rotasieverdamper is die oplossing onder vakuum by 32°C droog ingedamp en die soliede materiaal in gedistilleerde water, wat enkele druppels etanol bevat het, opgelos en na 20 ml opge-  
maak.

#### 2.2.4.3 Kolomchromatografiese fraksionering van wynfenole.

Vir die verdere fraksionering van gekonsentreerde wynfenole is van kolomchromatografie met poliamied (Ultramid B.M.) en gelfiltrasie (Sephadex) gebruik gemaak. Poliamied is o.a. deur Neu (1958), Chandler & Swain (1959) en Chandler & Harper (1962) vir die fraksionering van fenoliese verbindings gebruik. Malan (1963) het van poliamied gebruik gemaak om die flavonoïed mono-

mere te skei van die polimere wat onomkeerbaar daaraan geadsorbeer word. Om gepolimeriseerde fenoliese verbindings uit 'n wyn te isoleer, het Somers (1966) van kolomchromatografie met Sephadex gebruik gemaak. Sephadex is 'n driedimensionele netwerk van polisakkariede kettings wat soos 'n molekulêre sif werk. Fenoliese verbindings word egter redelik sterk aan die gel-matriks geadsorbeer, gevolglik is nie net molekulêre grootte nie, maar ook adsorpsiekragte op die spel by die skeiding van fenoliese verbindings op Sephadex. Somers (1966) het gevind dat indien daar van etanol-water elueermiddels gebruik gemaak word, hierdie adsorpsiekragte aansienlik verminder.

#### 2.2.4.3.1 Chromatografie met poliamied.

Die poliamied is voorberei soos beskryf deur Chandler & Swain (1959). Die suspensie is in 'n glaskolom van 45 cm x 3 cm met 'n sinterglasskyf aan die onderent, oorgebring en toegelaat om vanself vas te sak. Die voorbereide kolom het die volgende spesifikasies gehad: Bedvolume: 250 ml, nulvolume: 120 ml, vloeispoed: 40 ml/u.

Op die kolom is 10 ml van elk van die met loodasetaat gepresipiteerde en met HCl aangesuurde konsentrate van die Pontakwyn en perswyn afsonderlik opgedra. Die elueermiddels wat vir fraksionering gebruik is, was in die volgorde van gebruik:

50 persent etanol (0.2 persent asynsuur)	....	tweemaal die nulvolume
80       "       "       "       "       "	....	eenmaal die nulvolume
96       "       "       "       "       "	....	eenmaal die nulvolume

Met 'n LKB-fraksiesnyer is die eluaat in 10 ml fraksies opgevang. Die kleur van die eluaat het 'n goeie aanduiding van die vordering van die elueringsproses gegee. Waar die eluaat liggekleurd of kleurloos was, is die optiese digtheid van die fraksies in 'n spektrofotometer by 280 m $\mu$  (maksimum absorpsie van kleurlose fenoliese verbindings) gemeet.

Die Pontakwyn het op hierdie kolom slegs een helderrooi sone opgelewer. Hierdie sone het saam met die front van die eerste elueermiddel in die kolom afbeweeg. Deur verdere eluering en absorpsiemetings by 280 m $\mu$  kon geen ander sones van die kolom verkry word nie. By die opdrapunt was 'n onbeweeglike sone wat waarskynlik gepolimeriseerde fenoliese verbindings was. Die fraksies wat die rooi sone bevat het, is gekombineer en onder vakuum by 32°C droog ingedamp en weer opgelos in presies 10 ml gedistilleerde water.

Die wit perswyn het ook slegs een sone wat liggeel gekleurd was en saam met die front van die eerste elueermiddel in die kolom afbeweeg het, opgelewer. Die fraksies wat hierdie sone bevat het, is gekombineer en verder soos dié van die Pontakwyn behandel.

#### 2.2.4.3.2. Chromatografie met Sephadex.

Sephadex (G25) is in 60 persent etanol gesuspendeer en toegelaat om oornag uit te swel, waarna die bostaande vloeistof gedekanteer is. Die gel is oorgebring in 'n glaskolom van 45 cm x 3 cm met 'n sinterglasskyf aan die onderent. Op laasgenoemde

skyf is vooraf 'n lagie glasballetjies van 0.5 mm deursnit geplaas om te verhoed dat die gel die sinterglas binnedring. Die kolom is voorsien van 'n watermantel waardeur water teen 26°C gesirkuleer is. Voordat die monsters opgedra is, is 60 persent etanol (0.2 persent asynsuur), wat ook as elueermiddel gebruik is, vir twee uur teen 'n vloeispoed van 25 ml/u deur die kolom gestuur. Die voorbereide kolom het die volgende spesifikasies gehad: bedvolume: 250 ml, nulvolume: 110 ml, vloeispoed: 25 ml/u.

Op die kolom is 10 ml van die konsentrate van Pontakwyn en perswyn afsonderlik opgedra. Genoemde elueermiddel is gebruik en die eluaat is soos vantevore in 10 ml fraksies opgevang. Absorpsiemetings by 280 m $\mu$  is gedoen waar die kleur van die eluaat nie 'n aanduiding van die elueringsproses was nie.

Die Pontakwyn het op hierdie kolom drie sones opgelewer. Saam met die front van die elueermiddel het 'n donkerrooi sone van vermoedelik hoë molekulêrgewig verbindings beweeg. Direk na die eerste sone het 'n tweede helderrooi sone gevolg. Met behulp van absorpsiemetings by 280 m $\mu$  is vasgestel dat na die tweede sone, 'n verdere aantal fraksies met kleurlose fenoliese verbindings daarin, geëlueer is. Die grootste gedeelte van die kleurlose verbindings is skynbaar saam met die rooi gekleurde sones geëlueer, aangesien daar geen duidelike skeiding tussen die tweede en derde sones was nie. Daardie gedeeltes van die eluaat wat die verskillende sones verteenwoordig het, is onder



vakuum by 32°C droog ingedamp en elkeen afsonderlik weer opgelos in presies 10 ml gedistilleerde water.

Die wit perswyn het slegs een geelbruin gekleurde sone wat tydens die elueringsproses baie verbreed het, opgelewer. Die eluering is volgehou totdat absorpsiemetings by 280 m $\mu$  geen verdere fenoliese verbindings aangewys het nie. Volgens die beginsels van chromatografie met Sephadex, behoort sones van beide hoë en lae molekulêrgewig verbindings te voorskyn gekom het. Dit wil voorkom asof in bogenoemde geval 'n ondoeltreffende skeiding verkry is weens sterk adsorpsiekragte en gevolglike verbreding van sones. Daardie fraksies wat volgens absorpsiemetings fenoliese verbindings bevat het, is gekombineer en verder soos bogenoemde Pontakfraksies behandel.

#### 2.2.5 Bepaling van gistingsnelheid en gistingsdoeltreffendheid

In laboratorium eksperimente word die verloop van 'n gistingsproses normaalweg gevolg deur die daaglikse gewigsverlies aan koolsuurgas grafies teen die tyd voor te stel. Hierdie metode hou verskeie nadele in. Indien gisgroei enigsins geaffekteer sou word deur die aanwesigheid van toetsverbindings in die medium, sal die gistingstempo's noodwendig verskil as gevolg van verskille in gisselgetalle. 'n Ander nadeel is dat die redelik groot volumes gistingsmedium wat in sulke eksperimente gebruik word, ook relatief groot hoeveelhede van die toetsverbindings vereis. 'n Meer akkurate metode wat onder strenger gekontroleerde toestande uitgevoer word, is 'n manometriese metode soos deur Thorne

(1954a) ontwerp is. Die metode is deur genoemde outeur gebruik om die gistingsnelheid en inherente gistingsdoeltreffendheid van verskillende gisrasse te bepaal. Die volume koolsuurgas wat 'n spesifieke gewig gisselle per tydseenheid in 'n standaardmedium vrystel, word akkuraat bepaal. Die gistingsflessies word teen 'n konstante tempo geskud om 'n egalige ontsnapping van gas te verseker en flokkulasie van die gisselle te verhoed. Die standaardmedium bevat geen stikstof nie, sodat gisgroei tydens die eksperiment sover as moontlik verhoed word. Die gistingsnelheid op enige stadium tydens die gistingsproses word gedefinieer as:

$$\text{Gistingsnelheid } (\bar{\phi}) = \frac{60}{G} \times \frac{\Delta V}{\Delta t} \quad (\text{ml CO}_2/\text{u/g gis})$$

waar :  $G$  = gewig nat gis (g/ml)

$\Delta V$  = ml CO<sub>2</sub> by N.T.D. vrygestel in tydinterval  $\Delta t$  (min)

Die hoofdeel van die gistingsproses word gekarakteriseer deur die gemiddelde gistingsnelheid ( $\bar{\phi}$ ) tot op die stadium wanneer 80 persent van die totale volume koolsuurgas vrygestel is. Vir die berekening daarvan, word  $\Delta V$  en  $\Delta t$  in bostaande formule onderskeidelik vervang deur  $V^{80}$ , wat 80 persent van die totale volume vrygestelde koolsuurgas voorstel, en  $t^{80}$ , die tyd benodig daarvoor.

Thorne (1954b) het egter gevind dat die gemiddelde gisting-snelhede van verskillende kulture van dieselfde gisras aansienlik kan verskil. Hy vind egter ook dat gemiddelde gisting-snelheid slegs afhanklik van die stikstofgehalte van die gisselle is en formuleer die verhouding as volg:



$$\frac{\bar{\phi}}{N} = K$$

waar:  $\bar{\phi}$  = gemiddelde gistingsnelheid

N = stikstofgehalte van die gisselle

K = gistingsdoeltreffendheid.

Die waarde van gistingsdoeltreffendheid dien as 'n aanduiding van die inherente gistingsvermoë van 'n gisras. Die bepaling van gistingsdoeltreffendheid kan dus dien om gisrasse onderling te vergelyk en ook die toestand van 'n spesifieke gisras van tyd tot tyd vas te stel.

In bostaande formule dien die stikstofgehalte as 'n korreksiefaktor vir die fisiologiese toestand van die gisselle wat getoets word. Stikstofgehalte (N) kan dus in genoemde formule vervang word deur 'n beter term, nl. fisiologiese toestand (F). Fisiologiese toestand is egter 'n begrip wat nie maklik in syfers uitgedruk kan word nie. Stikstofgehalte het egter 'n redelik betroubare maatstaf van fisiologiese toestand geblyk te wees en is ook suksesvol in die bepaling van gistingsdoeltreffendheid gebruik.

Die metode van Thorne is in sommige opsigte gewysig om by hierdie studie aan te pas. Om die invloed van verskillende fraksies wynfenole op die gistingsproses te bepaal, is die volgende wysigings ingevoer: Slegs een gisras is gebruik, sodat die inherente gistingsvermoë dus 'n konstante faktor gemaak is. In plaas van 'n standaard gistingsmedium te gebruik, is die gistingsmedia gevarieer deur die byvoeging van verskillende fraksies wynfenole by die standaard medium. Gevolglik sou enige variasie

in die gistingsnelhede 'n aanduiding van die effek van die toegevoegde wynfenole wees.

Om die invloed van langdurige kontak met dop-en pitekstrakte op gisselle te bepaal, was die wysigings as volg: 'n Spesifieke gisras is aan verskillende konsentrasies dop-en pitekstrakte blootgestel. Na afloop van dié behandelings is die stikstofgehaltes, asook gistingsnelhede en gistingsdoeltreffendhede van die onderskeie groepe gisselle in 'n standaard medium, bepaal. Verskillende opsigte van stikstofgehaltes behoort dus op verskille in fisiologiese toestand te dui. Indien die stikstofgehaltes nie wesenlik verskil nie, maar gistingsdoeltreffendhede wel, sal laasgenoemde dui op verskille in fisiologiese toestand wat nie in die stikstofgehaltes nie, maar wel in gistingsnelhede weerspieël word.

#### 2.2.5.1 Bereiding van standaard gistingsmedium.

Die medium van Thorne (1954a) is onveranderd gebruik en het die volgende bestanddele wat tot 1 liter met gedistilleerde water opgemaak is, bevat:

Glukose	:	100g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	:	8.84g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	:	0.595g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	:	2.13g
$\text{CaCl}_2$	:	0.417g

Waar die invloed van verskillende fraksies wynfenole in die gistingsmedium op gistingsnelheid nagegaan is, is bostaande

medium slegs tot 900 ml met gedistilleerde water opgemaak. Van die oplossings van die fraksies wynfenole is dan 1 ml hoeveelhede by 9 ml hoeveelhede van die meer gekonsentreerde medium gevoeg.

#### 2.2.5.2 Bepaling van verloop van gisting met behulp van 'n Warburg-apparaat.

Die gisselsuspensies wat gebruik is, is vir 'n halfuur goed geskud om 'n homogene suspensie te verseker. In gekalibreerde Warburgflessies (sonder sentrale reservoir) is 1 ml van die betrokke gisselsuspensie(s) gepipetteer. Die lug is uit die flessies en manometriese sisteme met behulp van stikstofgas verplaas. Vervolgens is die flessies met gis vir 10 minute in die waterbad van die apparaat (20°C) geplaas. Afhangende van die proefuitleg van die betrokke eksperiment, is die verskillende gistingsmedia of die standaard medium ook by 20°C konstant gehou. 'n Stophorlo-sie is in werking gestel toe 1 ml gistingsmedium in die eerste gistingsflessie gepipetteer is. Die flessie se prop is dig gesluit, die kwikhoogtes in die manometer op die gekalibreerde nulmerk ingestel en die gisruimte van die atmosfeer afgesluit. Met tussenposes van presies een minuut is dieselfde prosedure met die oorblywende flessies herhaal. Nadat die laaste flessie gereed gemaak is, is die skudaksie van die apparaat teen 130 ossillasies per minuut, in werking gestel. Na tydintervalle van presies tien minute, is die skudaksie gestop, die drukverskille in die manometers genoteer, die gevormde koolsuurgas toegelaat om te ontsnap en die manometers weer op die nulmerk ingestel. Aangesien

alle stelling lesings nie op dieselfde dag verkry kon word nie, moes die daaglikse verskille in atmosferiese temperatuur en druk in berekening gebring word. 'n Thermo-barometer (Manual of Microbiological Methods, 1957) is gevolglik by alle eksperimente ingesluit, met behulp waarvan resultate wat nie op dieselfde dag verkry is nie, met mekaar vergelyk kon word.

#### 2.2.5.3 Bepaling van droë gewig van gisselle.

In vooraf geweegde glasflessies is 1 ml van die betrokke gisselsuspensie gepipetteer en vir 24 uur by 80°C gedroog. Daarna is die flessies vir 'n verdere periode van 24 uur in 'n desikkator oor fosforpentoksied gehou alvorens dit geweeg is.

#### 2.2.5.4. Bepaling van nat gewig van gisselle.

Die gewig nat gis per ml soos benodig in die formule vir die berekening van gistingssnelheid, is verkry deur die gewig droë gis te vermenigvuldig met die konvensionele faktor van 4.5 (Thorne, 1954a).

#### 2.2.5.5 Bepaling van stikstofgehalte van gisselle.

Die flessies met droë gisselle wat in die gewigsbepaling van die groepe gisselle verkry is, is gebruik vir die bepaling van die stikstofgehalte daarvan. Die bepaling van stikstof het geskied in 'n Technicon „Auto-Analyser" volgens Industriële Metode 31-69A van Technicon. Die stikstofgehalte van die gisselle is uitgedruk as die persentasie stikstof in die nat gewig daarvan.

#### 2.2.6 Vorbereiding van gisselsuspensies.

In alle gevalle waar gisselle in optimale fisiologiese toe-

stand benodig is, is die gisselsuspensies as volg voorberei: Vanaf die voorraadkultuur is die gisras vir vier periodes van twee dae elk by 20°C in verdunde, ontsuurde druiwemos geregenereer. Hierdie mos medium is berei deur druiwemos met 7 g/l kalsiumkarbonaat te ontsuur en daarna om die helfte met gedistilleerde water te verdun. Vanaf die jongste kultuur is 'n oorenting in 500 ml hoeveelhede van dieselfde medium gedoen. Na gisting vir vier dae by 20°C is die gisselle deur sentrifugering herwin. Daarna is die gisselle driemaal gewas deur suspendering in kalsiumchloried-oplossing (0.417 g/l) en daaropvolgende sentrifugering. Na die finale sentrifugering is die gisselle in die kalsiumchloried-oplossing gesuspendeer om die gewenste populasie gisselle te verkry.

#### 2.2.7 Bepaling van gisselvermeerdering met behulp van die toetsskyfie-metode.

Die toetsskyfie-metode soos gebruik deur Powers, Somaatmadja, Pratt & Hamdy (1960) asook Dadak (1967) is in hierdie ondersoek aangewend om die invloed van gefraksioneerde wynfenole op die groei van gisselle vas te stel.

Die gisrase<sup>en</sup> bakterie wat getoets is, is in mos medium (2.2.6) geregenereer. Mos-agar medium is berei deur 1.5 persent agar by genoemde mos medium te voeg. Die geregenereerde kulture is gebruik om proefbuise met gesmelte mos-agar medium in te ent, waarna plate in Petribakkies gegiet is. Elkeen van die ses fraksies wynfenole (Tabel 3) is op 'n aantal dik filtreerpapierskyfies („Whatman Antibiotics assay discs") aangebring, deur die



verskillende oplossings herhaaldelik op die skyfies te drup en die oplosmiddel (water) toe te laat om te verdamp. Vervolgens is dié skyfies sowel as kontroleskyfies sonder toetsverbindings, elk een afsonderlik in die middel van die verskillende geïnkuleerde agarplate vasgedruk. Die Petribakkies is vir een uur in 'n koelkas geplaas sodat die fenoliese verbindings in die medium kon diffundeer alvorens die organismes begin groei. Daarna is die bakkies in 'n broeikas by 25°C geïnkubeer.

Die plate is met gereelde tussenposes ondersoek om vas te stel wanneer kolonies begin sigbaar word. Die afwesigheid van enige kolonies in die sone direk rondom die toetsskyfie is as 'n positiewe kriterium van inhibisie beskou.

#### 2.2.8 Ekstrahering van druifdop en-pit fenole.

Die ekstrahering van fenoliese verbindings uit doppe en pitte is volgens die metode van Singleton & Draper (1964) gedoen. Die doppe en pitte is afsonderlik in eenhede van 50g vir twee minute in 'n „Waring blender" in die aanwesigheid van 100 ml 95 persent etanol, fyn gekerf. Die pulp is deur kaasdoek filtreer en die soliede materiaal weer teruggebring in die „Waring blender". Die proses is herhaal met 'n verdere porsie 100 ml 95 persent etanol, waarna 'n finale ekstraksie met 100 ml 50 persent etanol op 'n soortgelyke manier gedoen is. Ge-noemde fraksies is gekombineer en met behulp van Kieselguhr blink filtreer. Die alkohol van die twee ekstrakte is in 'n rotasieverdamper onder vakuum by 32°C afgedamp.

Ongeveer 1,400 ml dopekstrak met 'n totale fenolgehalte van 11.5 g/l gallussuur ekwivalente, is verkry. Die pitekstrak het ongeveer 1,300 ml met 'n totale fenolgehalte van 20.5 g/l gallussuur ekwivalente, bedra. Ontledings het aangetoon dat beide ekstrakte vry was van etanol. 'n Bepaling van reduserende suikers het getoon dat die pitekstrak heeltemal vry was daarvan, maar die dopekstrak het nog 8.7g suiker per 100 ml bevat.

#### 2.2.9 Bepaling van gisselvermeerdering onder aerobiese toestande.

Van die verskillende media is 50 ml hoeveelhede in gesteriliseerde glasflessies met „Cap-o-test” metaaldoppies, gepipetteer. Elke flessie is ingeënt met 0.5 ml van 'n suspensie van gisras W.E. 14 wat ongeveer  $1 \times 10^8$  gisselle per ml bevat het. Genoemde metaaldoppies sluit nie dig nie en het dus verseker dat aerobiese toestande in die flessies gehandhaaf is. Onmiddellik na inenting is die flessies in 'n skud-waterbad by 25°C geplaas. Na 'n halfuur is met behulp van steriele pipette 1 ml monsters uit elke flessie getrek. Die monsters is in toegesmelte glasampules by -10°C bewaar totdat seltellings daarop gedoen kon word. Vervolgens is elke ses uur op 'n soortgelyke wyse monsters getrek en bewaar.

Voordat seltellings gedoen is, is die monsters ontdooi en vir 'n halfuur geskud om 'n homogene suspensie te verseker. Daarna is die ampules oopgemaak en die nodige verdunnings van die monsters gedoen.



## 2.2.10 Bepaling van gisselvermeerdering onder anaerobiese toestande.

Tydens gisting is die gisselle geneig om op die bodem van die houer te versamel. Om monsters vir seltellings te trek, is dit dus nodig dat die medium net voor monsterneming deeglik geroer word. Terselfdertyd moet egter gesorg word dat die anaerobiese toestande tydens beroering gehandhaaf word. Gevolglik is daar van spesiale gistingsflesse gebruik gemaak.

'n Wye-nek glasbottel is voorsien van 'n kurkprop waardeur 'n glasroerder gemonteer is. Die prop was ook voorsien van 'n dun glasbuisie met 'n styfpassende watteprop waardeur koolsuurgas tydens die roerproses kon ingelei word. Verder was die prop ook voorsien van 'n wyer glasbuisie met 'n watteprop, waardeur monsters van die medium met 'n pipet getrek kon word. Die flesse is voor gebruik as 'n eenheid in 'n outoklaaf gesteriliseer.

Van die verskillende media is 200 ml hoeveelhede in genoemde gistingsflesse gepipetteer. Elke fles is ingeënt met 1 ml van 'n suspensie van gisras W.E. 14 wat ongeveer  $1.2 \times 10^8$  gisselle per ml bevat het. Aanvanklik is elke 12 uur en later elke 24 uur monsters uit die flesse getrek, nadat elke fles vir vyf minute deur 'n elektriese roerder geroer was. Koolsuurgas is tydens beroering in die flesse ingelei. Die 1 ml monster wat met 'n steriele pipet uit elke fles getrek is, is by 1 ml 35 persent etanol in 'n proefbuis gevoeg. Die byvoeging by die etanol was om te verhoed dat verdere seldeling plaasvind tot

tyd en wyl seltellings enkele ure later gedoen is.

Voor en na elke monsterneming is die gistingsflesse geweeg om die daaglikse gewigsverlies aan koolsuurgas vas te stel.

#### 2.2.11 Gisseltellings

Met 'n skoon, gevlamde oognaald is 'n druppel van die betrokke gisselsuspensie op 'n Thoma-model haemasitometer oorgebring. Die metode van Cassell (1965) is gebruik om te bereken hoeveel gisselle getel moes word om 'n betroubaarheid van 99 persent te verkry. 'n Moedersel met 'n waarneembare botsel is as twee selle getel.

### HOOFSTUK 3

#### RESULTATE EN BESPREKING

##### 3.1 Die invloed van druifdoppe, -pitte en -stingels van verskillende cultivars op die gistingsproses.

Die grootste gedeelte van die fenoliese verbindings in die druif is teenwoordig in die doppe, pitte en stingels (verskeie outeurs volgens Singleton & Esau, 1969). Kontak tussen mos en soliede druifmateriaal is dus van die belangrikste faktore wat die konsentrasie fenoliese verbindings in wyn sal bepaal (Du Plessis & De Wet, 1968). Deur dus die verloop van gisting en ontledingsdata van moste wat op verskillende hoeveelhede doppe, pitte en stingels gegis het, na te gaan, kan tot 'n mate vasgestel word wat die invloed van fenoliese verbindings op die gistingsproses was. Indien druiwemos op genoemde druifkomponente gegis word, soos ten dele in die wynbedryf standaardpraktyk is, word nie slegs fenoliese verbindings nie, maar ook ander bestanddele geëkstraheer. Gistingsverskille wat in sulke gevalle waargeneem mag word, kan dus nie sonder meer aan die invloed van die druif-fenole alleen toegeskryf word nie.

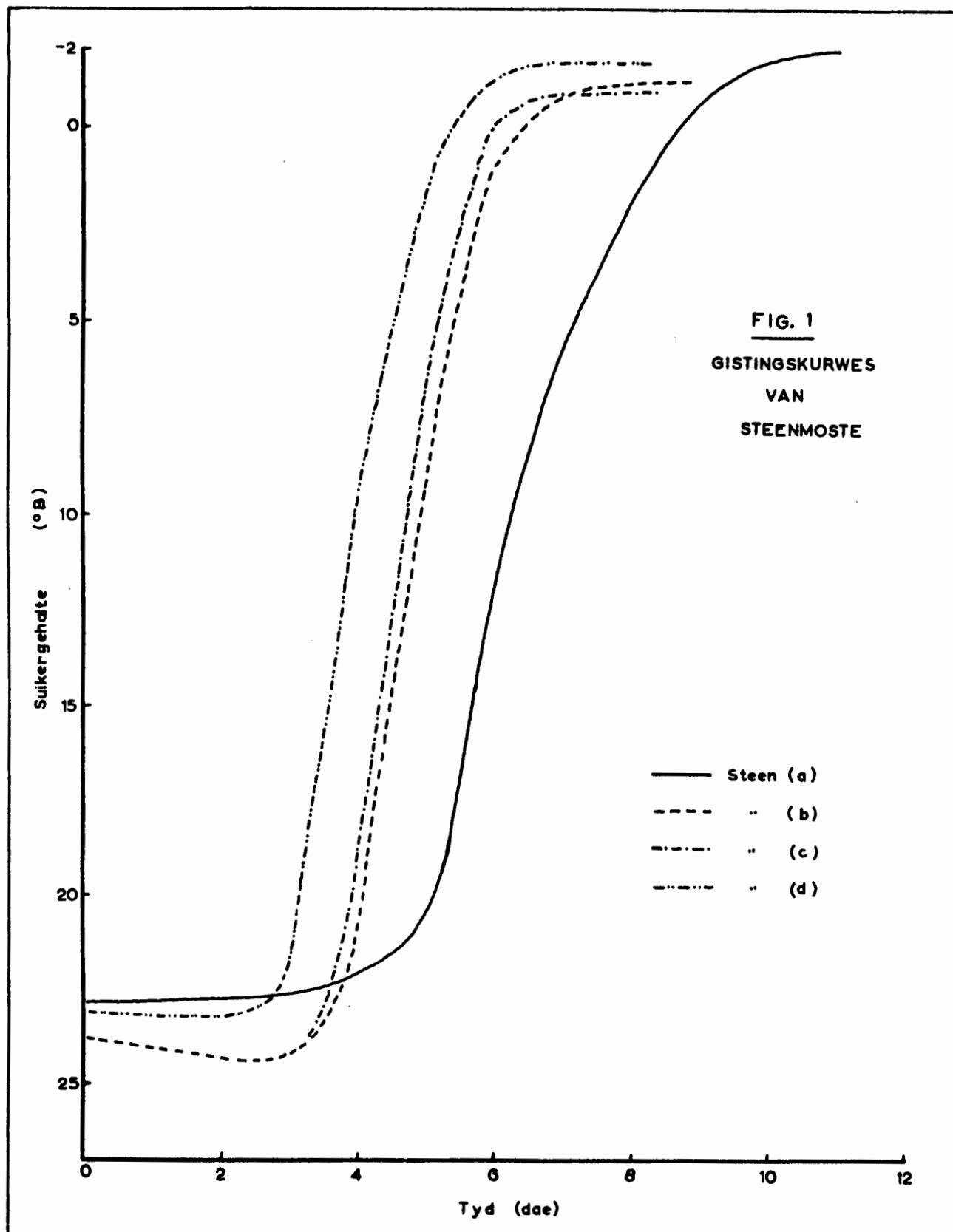
In hierdie eksperiment is van elkeen van die genoemde (2.1.1) cultivars, wyne met die volgende behandelings berei:

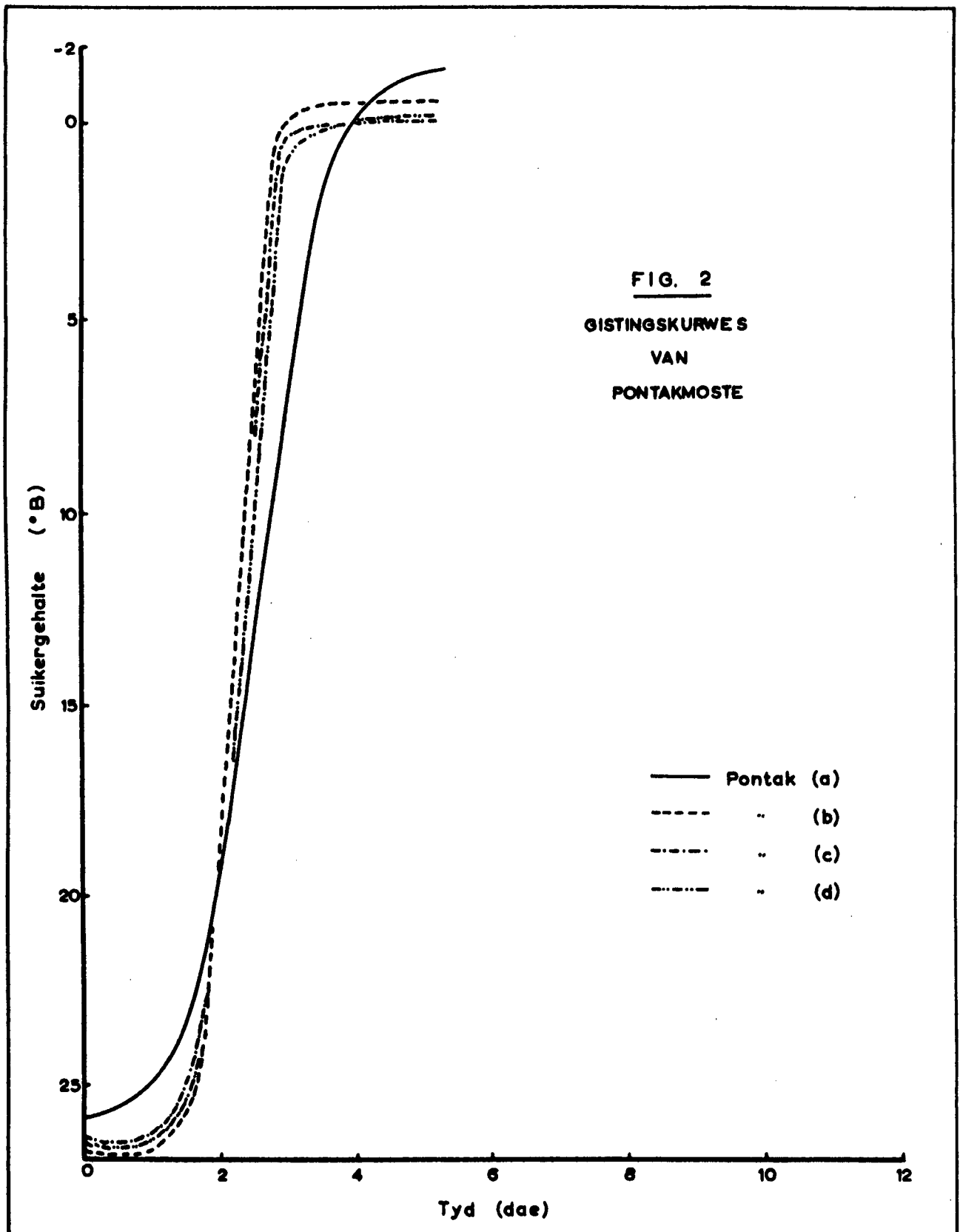
- (a) Gisting van afloopmos in afwesigheid van doppe, pitte of stingels. (Kontrole behandeling)
- (b) Gisting van mos op die normale hoeveelheid doppe en pitte.

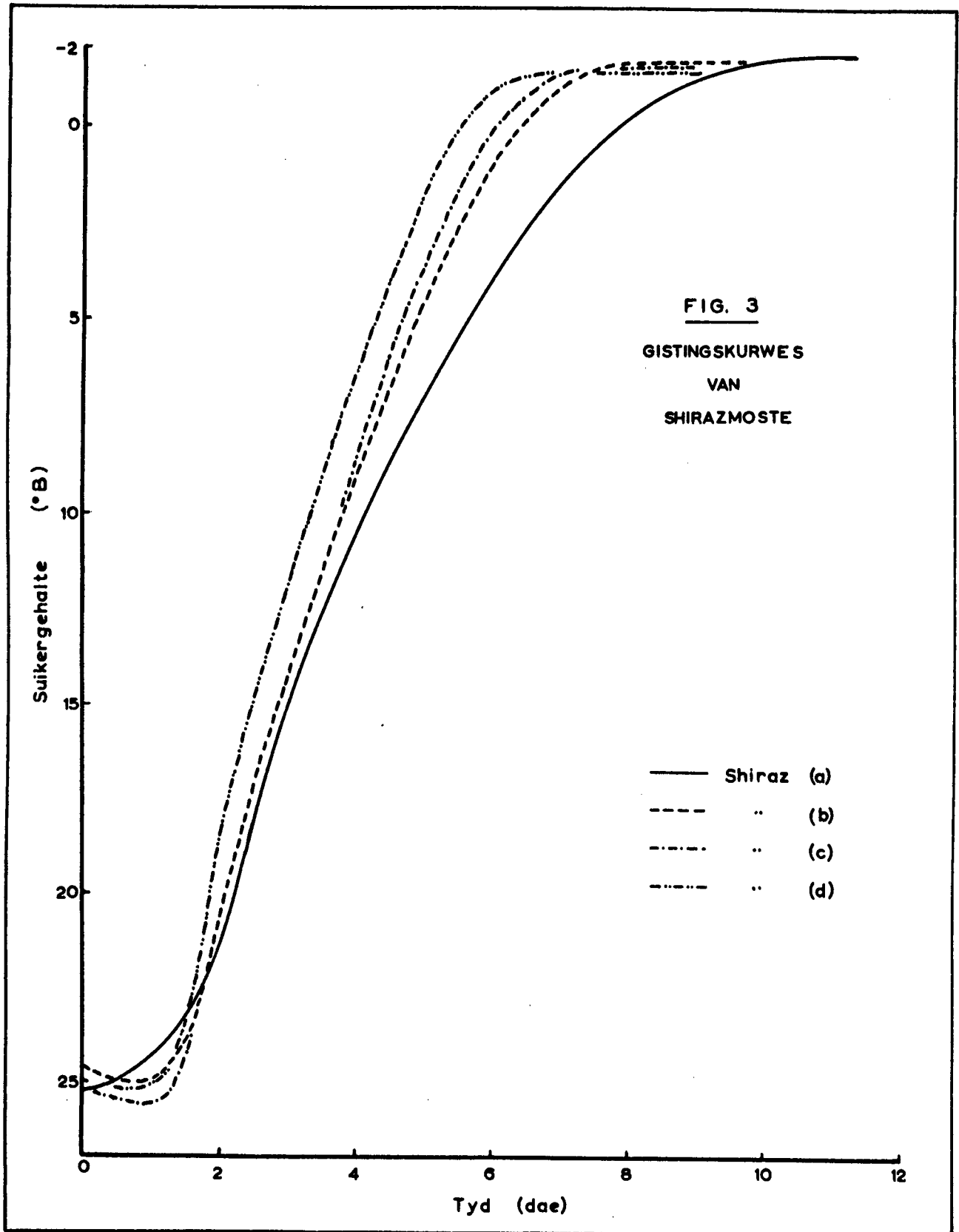
- (c) Gisting van mos op ongeveer tweemaal die normale hoeveelheid doppe en pitte.
- (d) Gisting van mos op die normale hoeveelheid doppe, pitte en stingels. Hierdie behandeling is in die geval van die cultivar Steen gewysig in die opsig dat die mos na 'n kontakperiode van 12 uur van die doppe, pitte en stingels geskei is. Hierdie afwyking met Steen is gedoen om 'n behandeling wat in die praktyk mag voorkom, na te boots.

Met behulp van die daaglikse Ballinglesings is gistingskurwes vir elke behandeling opgestel. Hieruit (Fig. 1 tot 4) blyk dat al die moste 'n redelik normale verloop van gisting gehad het. Geen tekens van 'n slepende gisting, of gisting wat bly steek het, kon gevind word nie. In genoemde figure dui die letters (a) tot (d) op die onderskeie behandelings soos hierbo aangegee. Die gistingskurwes van die Pontakmoste met uitsondering van Pontak (a) wyk effens van die normale af. Nadat die gisting ingetree het, is die gistingstempo geweldig hoog en net so skielik plat die kurwes af. Daar was feitlik geen periode van geleidelike daling in gistingstempo, soos by ander moste waargeneem is nie. Nadat die gisting so skielik tot stilstand gekom het, het daar nog vir enkele dae 'n baie stadige ontwikkeling van koolsuurgas plaasgevind. Hierdie stadige gisting het weliswaar nie die Ballinglesing merkbaar laat daal nie, tog dui dit daarop dat die laaste spore suiker langsam uitgegis is.

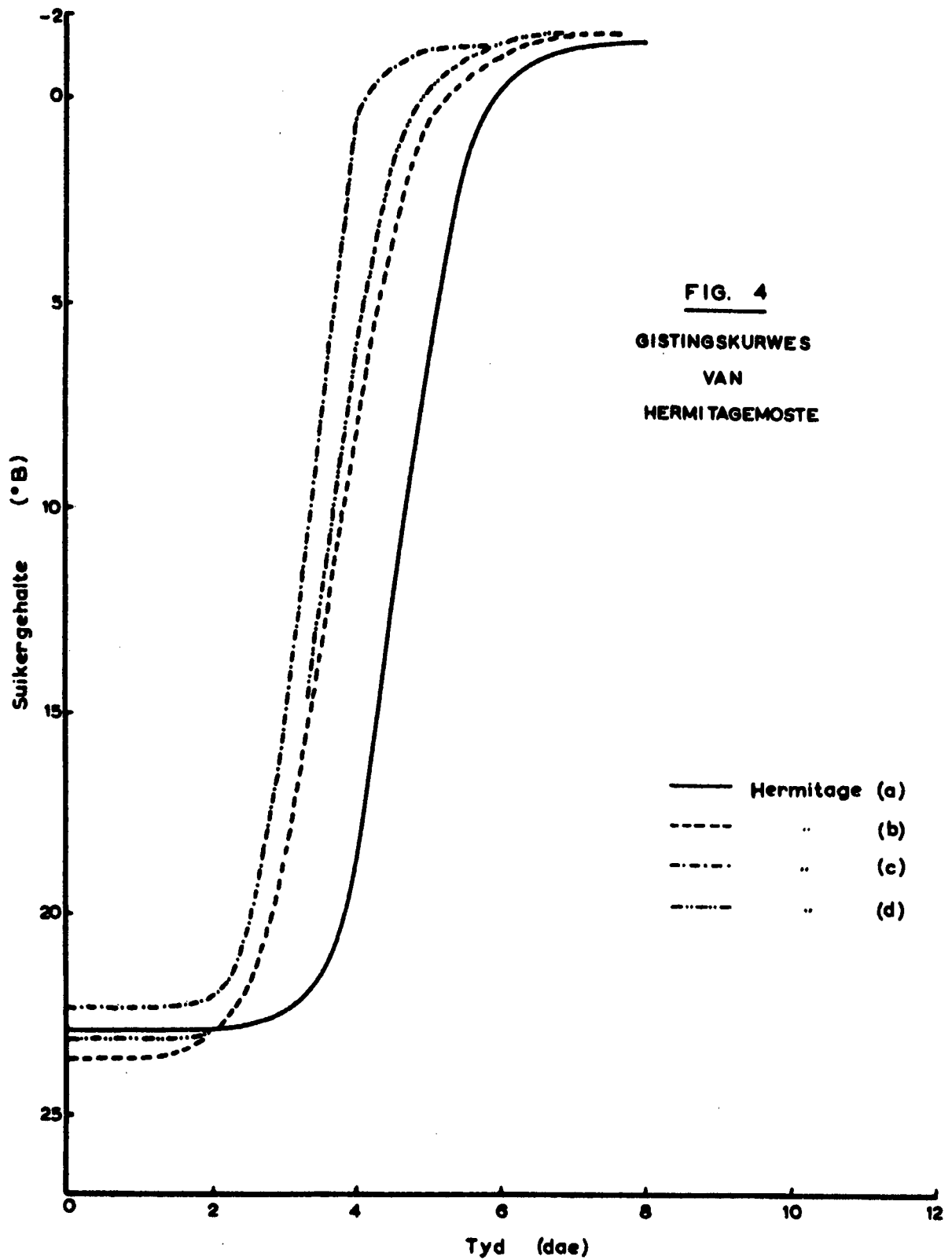
Die ontledingsdata op die wyne word in Tabel 1 weergegee. Die finale Ballinglesings van sommige wyne, dog veral dié van die Pontakwyne is redelik hoog. Hoewel dit hiervolgens wil voor-











TABEL 1. Ontledingsdata van eksperimentele wyne

Cultivar en Behandeling	Suikergehalte van Druive (OB)	Ballinglesing van Wyn (OB)	Suikergehalte ( g glukose/100 ml )	Totale fenolgehalte ( g/l gallussuur )	Alkohol ( vol. % )	Gliserol ( g/l )
Hermitage (a)	22.8	-1.4	0.06	0.288	13.29	-
" (b)	23.6	-1.5	0.09	0.974	13.71	-
" (c)	22.3	-1.3	0.07	1.37	12.76	-
" (d)	23.1	-1.5	0.08	1.135	13.43	-
Steen (a)	22.8	-1.9	0.09	0.284	12.76	8.6
" (b)	23.8	-1.1	0.16	0.717	12.76	10.4
" (c)	23.8	-0.8	0.20	1.080	13.94	10.7
" (d)	23.2	-1.6	0.13	0.426	12.88	8.9
Shiraz (a)	25.2	-2.1	0.13	0.572	14.28	10.0
" (b)	25.0	-1.7	0.11	1.490	13.77	11.2
" (c)	25.7	-1.5	0.14	2.195	14.62	11.2
" (d)	25.2	-1.3	0.08	1.780	13.99	12.1
Pontak (a)	25.8	-1.2	0.18	1.019	14.41	12.6
" (b)	26.7	-0.6	0.26	2.656	14.42	13.9
" (c)	26.3	-0.2	0.26	3.157	14.28	13.6
" (d)	26.5	-0.3	0.32	2.915	14.77	15.6

kom asof sommige moste nie droog gegis het nie en daar dus nog suikerreste in die wyne was, toon laasgenoemde waardes egter dat al die moste prakties gesproke droog gegis het. Die behandelings van Pontak het die hoogste suikergehaltes getoon, alhoewel die hoogste waarde van 0.32 persent nog nie noemenswaardig hoog is nie. Waar die Ballinglesings van sommige wyne hoër as normaal was, kon dit nie aan suikerreste alleen toegeskryf word nie. Die alkohol- en totale fenolgehaltes was in baie gevalle relatief hoog. Waar hierdie twee bestanddele albei baie hoog is, kan die eerste tekens van inhibisie verwag word (Schanderl, 1962). Die gliserolgehaltes van al die kontrolebehandelings was deurgaans laer as dié van die ander behandelings waar ook die totale fenolgehalte hoër was.

Dit wil dus voorkom of die gisting van mos in kontak met doppe, pitte en stingels en die daarmee gepaardgaande ekstraksie van druifkomponente, waaronder fenoliese verbindings, aanleiding kon gee tot die vorming van hoër gliserolgehaltes in die wyn. Laasgenoemde komponent word hoofsaaklik tydens die laaste stadia van gisting gevorm en dit kan aanvaar word dat dit nie van die druiwe afkomstig is nie (Venter, 1955). In die geval van Steen (d) waar die mos slegs voor gisting in kontak was met die doppe, pitte en stingels en ekstraksie dus nie so effektief as tydens gisting was nie, was die gliserolgehalte van die wyn ook merkbaar laer as byvoorbeeld by Steen (c). Dit is bekend dat die inhibisie van die normale roete in die Embden-Meyerhof-

Parnas skema tot verhoogde gliserolgehaltes tydens anaerobiese gisting kan lei (Neuberg volgens Nord & Weiss, 1958). Inhibeer-middels soos natriumsulfiet vorm 'n addissie produk met asetaldehied en gevolglik ontstaan die neiging dat die gereduseerde difosfopiridiennukleotied wat normaalweg hoofsaaklik deur die reduksie van asetaldehied na etanol geregenereer word, tot 'n groter mate geoksideer word deur die reduksie van dihidroksieasetoonfosfaat na gliserol. Aangesien fenoliese verbindings ook asetaldehied kan bind, is die moontlikheid nie uitgesluit dat gliserolgehalte in die wyn as maatstaf van die inhibisie van die gistingsproses kan dien nie.

Hoewel gisting dus nie merkwaardig deur enige behandeling beïnvloed is nie, was daar tog aanduidings van 'n stremmende invloed as gevolg van sekere behandelings. By veral die Pontakwyne was die suikerreste hoewel gering, deurgaans hoër as by ander behandelings. In eersgenoemde gevalle was die gliserol en totale fenolgehalte ook merkbaar hoër. Hoewel ook ander druif komponente 'n moontlike bydrae tot hierdie stremmende effek kon hê, wil dit voorkom asof so 'n effek deur fenoliese verbindings nie uitgesluit kon word nie en verdere ondersoek geregverdig sou wees.

### 3.2 Die Invloed van PVP-behandelings op die gisting van persmos en die hergisting van wyn.

Dittrich & Kerner (1966) het gevind dat die alkielesters van gallussuur toksies vir gisselle kan wees. Gallussuur is 'n normale bestanddeel van wyn, veral indien gisting op doppe

plaasgevind het (Hennig & Burkhardt, 1958). Hoër alkohole kom ook in lae konsentrasies in wyn voor (Usseglio-Tomasset volgens Amerine, Berg & Cruess, 1967). Dit is dus nie onmoontlik dat klein hoeveelhede alkielgallate tydens gisting kan ontstaan nie. Die hidrolise van die chlorogeensure tot kafeïenesuur, wat ook stremmend op gisting kan inwerk, is reeds genoem (Sikovec, 1966). Die moontlikheid bestaan egter dat indien inhiberende verbindings wel tydens gisting ontstaan, die uitwerking daarvan nie duidelik waarneembaar is nie, aangesien 'n noemenswaardige konsentrasie daarvan miskien eers teen die einde van die gistingsproses bereik is. Indien so 'n wyn aan 'n tweede gistingsproses sou onderwerp word, word 'n duidelik waarneembare nadelige invloed op die verloop van die tweede gisting verwag.

Wanneer die alkohol van 'n wyn afgedamp word en 'n toevoeging van 'n suikeroplossing en gisselle tot die wynresidu gemaak word, kan verwag word dat die wyn 'n tweede gisting sal ondergaan. Polivinielpirrolidoon (PVP) is 'n sintetiese polipeptied wat fenoliese verbindings uit 'n wyn kan adsorbeer. Deur dus een helfte van 'n wyn wat die produk van 'n normale gisting is, met oormaat PVP te behandel alvorens albei helftes aan 'n tweede gistingsproses onderwerp word, kan die aan- of afwesigheid van moontlike toksiese fenoliese verbindings vasgestel word.

Van elk van die voorbereide Pontakwyne (2.2.3) is 120 ml met 1 ml van 'n suspensie van gisras W.E. 353 ingeënt. Die gistingsflessies is van watterproppe voorsien en by 25°C geïnkubeer.

Die verloop van gisting is gevolg deur notering van die daaglikse gewigsverlies. Na afloop van die gisting is die suikergehaltes van elke monster bepaal.

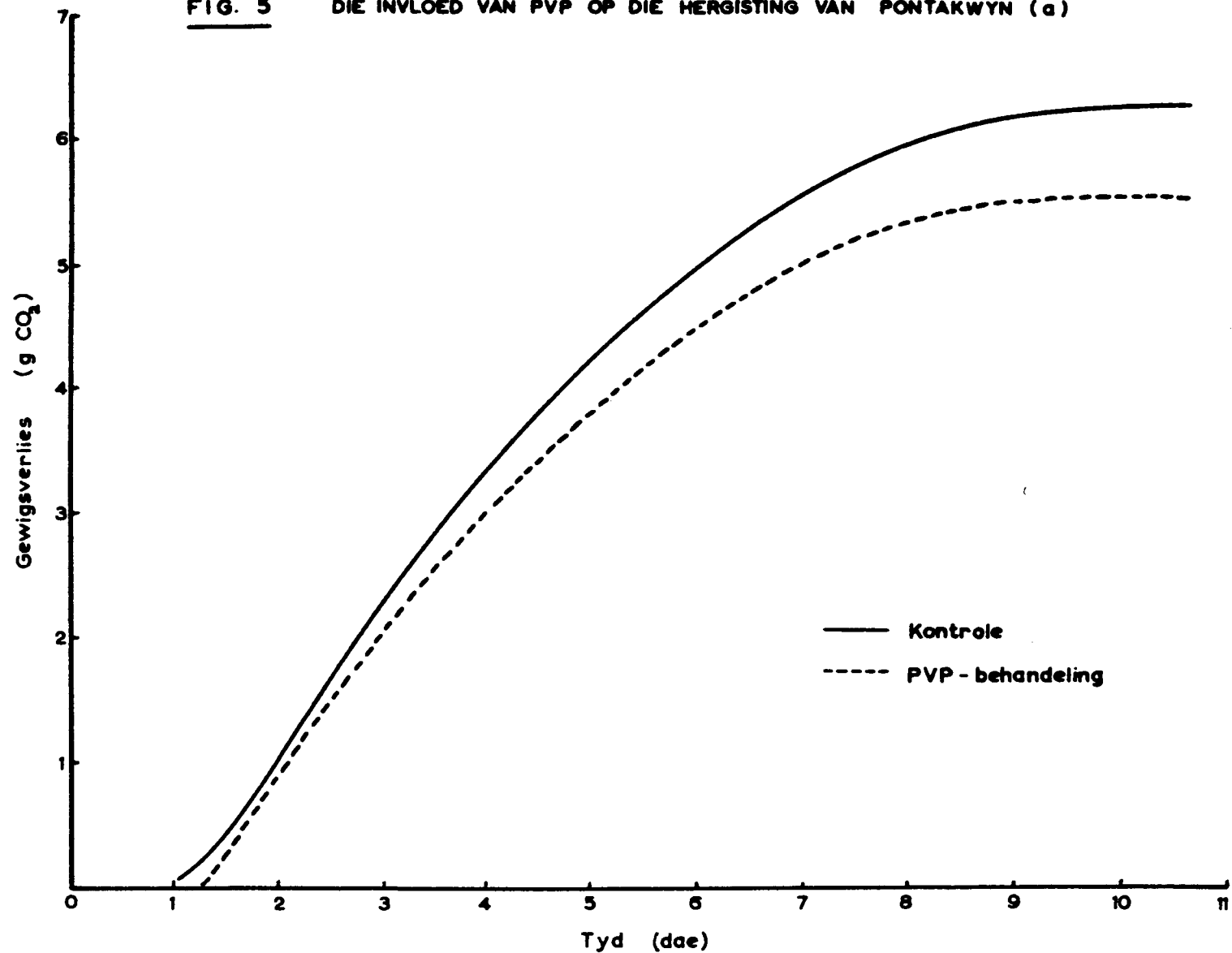
Uit die gistingskurwes (Fig. 5 tot 8) blyk dat die monsters wat vooraf met PVP behandel is, geensins beter gegis het as die ooreenstemmende monsters wat nie met PVP behandel is nie. Uit Fig. 5 en 7 blyk dat die PVP-behandeling selfs 'n verlaging in die totale gewig koolsuurgas wat vrygestel is, veroorsaak het. Die suikergehaltes (Tabel 2) toon ook dat alle monsters prakties gesproke, droog gegis het. Die fenoliese verbindings wat deur die PVP-behandeling verwyder is, was dus nie nadelig vir die gistingsproses nie.

Van elke behandeling van die persmos (2.2.3) is 200 ml hoeveelhede met 2 ml van 'n suspensie van gisras W.E. 353 ingeënt en die verloop van gisting gevolg deur notering van daaglikse gewigsverlies. Na afloop van die gisting is die suiker-, gliserol-, alkohol- en totale fenolgehaltes van die wyne bepaal.

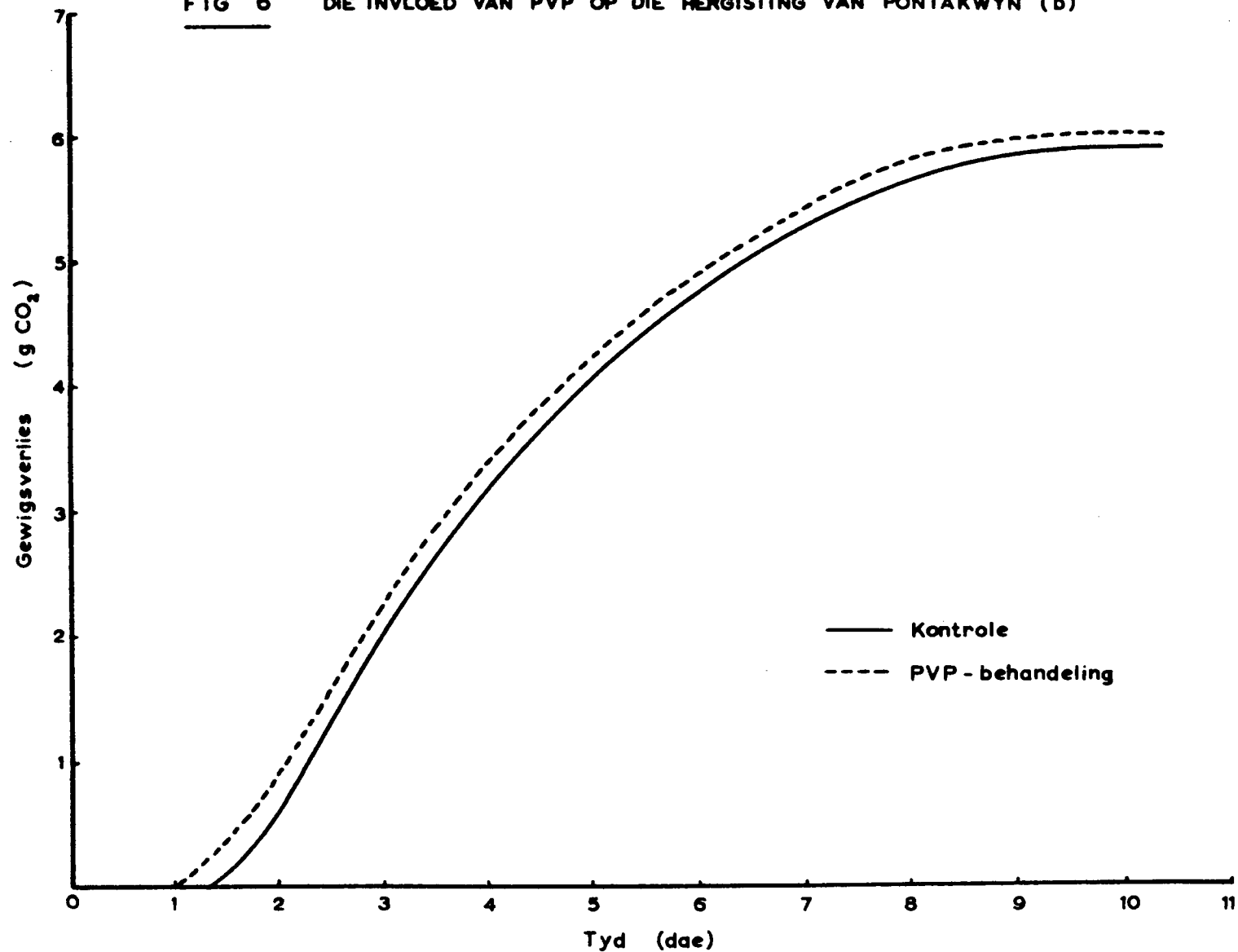
Die gistingskurwes (Fig. 9) toon duidelike verskille ten opsigte van die totale hoeveelheid koolsuurgas wat afgegee is. Die kontrole het heelwat minder koolsuurgas verloor as die monster wat vooraf met 50g PVP per 800 ml mos behandel is. Dit skep die indruk dat al die suiker in die kontrolemonster nie uitgegis het nie. Die ontledingsdata van die drie wyne word in Tabel 3 aangedui. Die belangrikste resultaat is dat aldrie wyne droog gegis het en dat die suikergehaltes nie noemenswaardig verskil



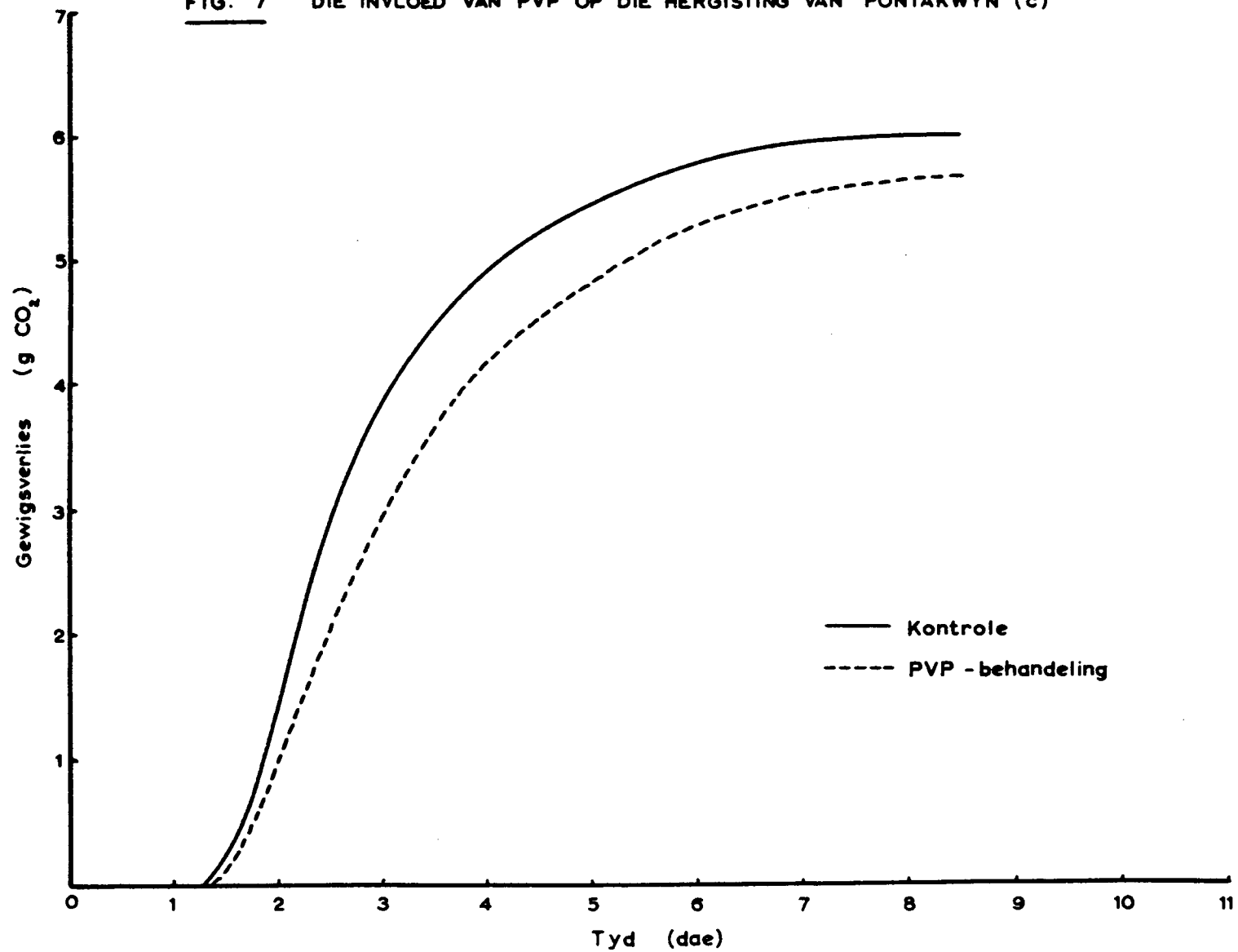
**FIG. 5**      **DIE INVLOED VAN PVP OP DIE HERGISTING VAN PONTAKWYN (a)**



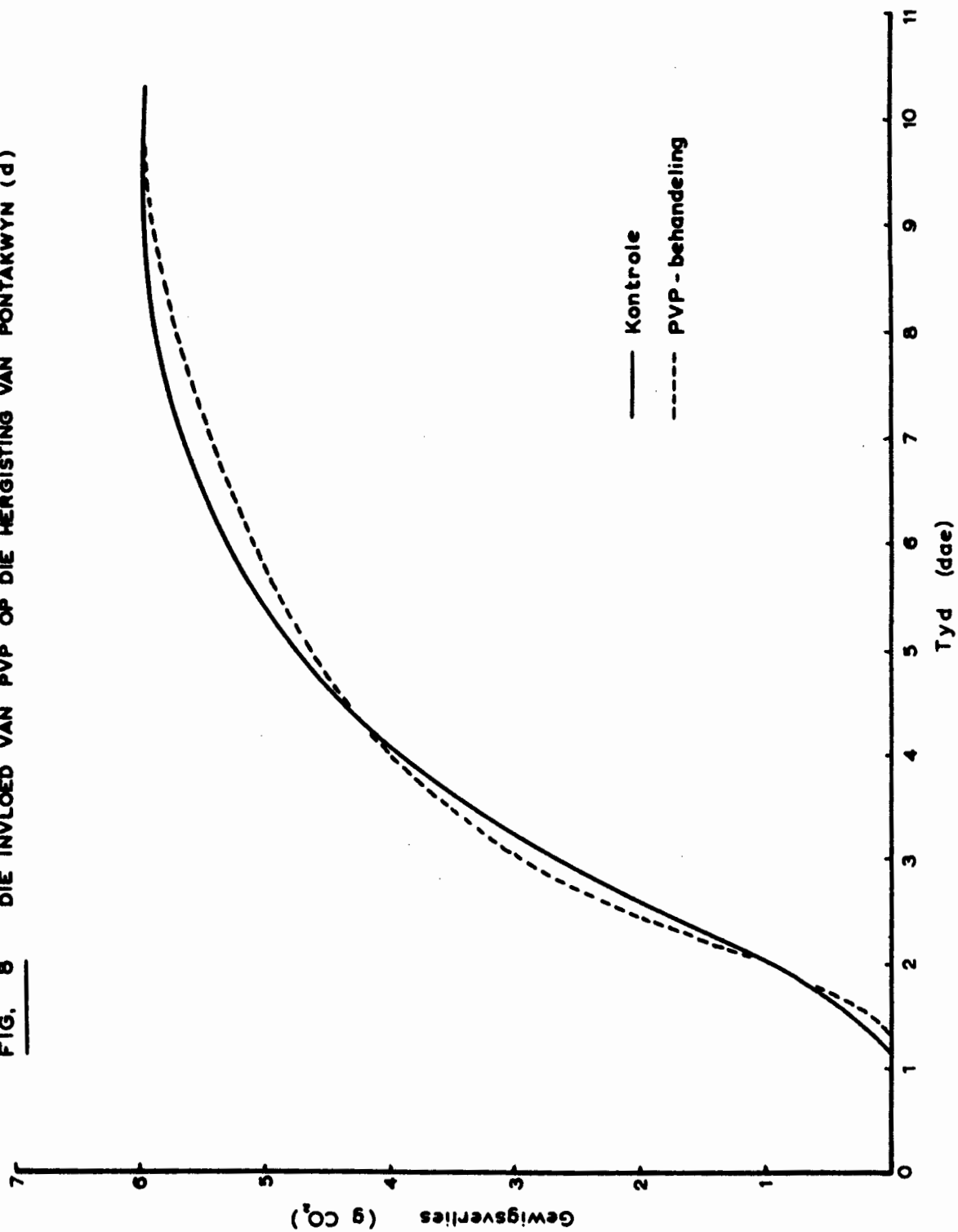
**FIG 6**    **DIE INVLOED VAN PVP OP DIE HERGISTING VAN PONTAKWYN (b)**



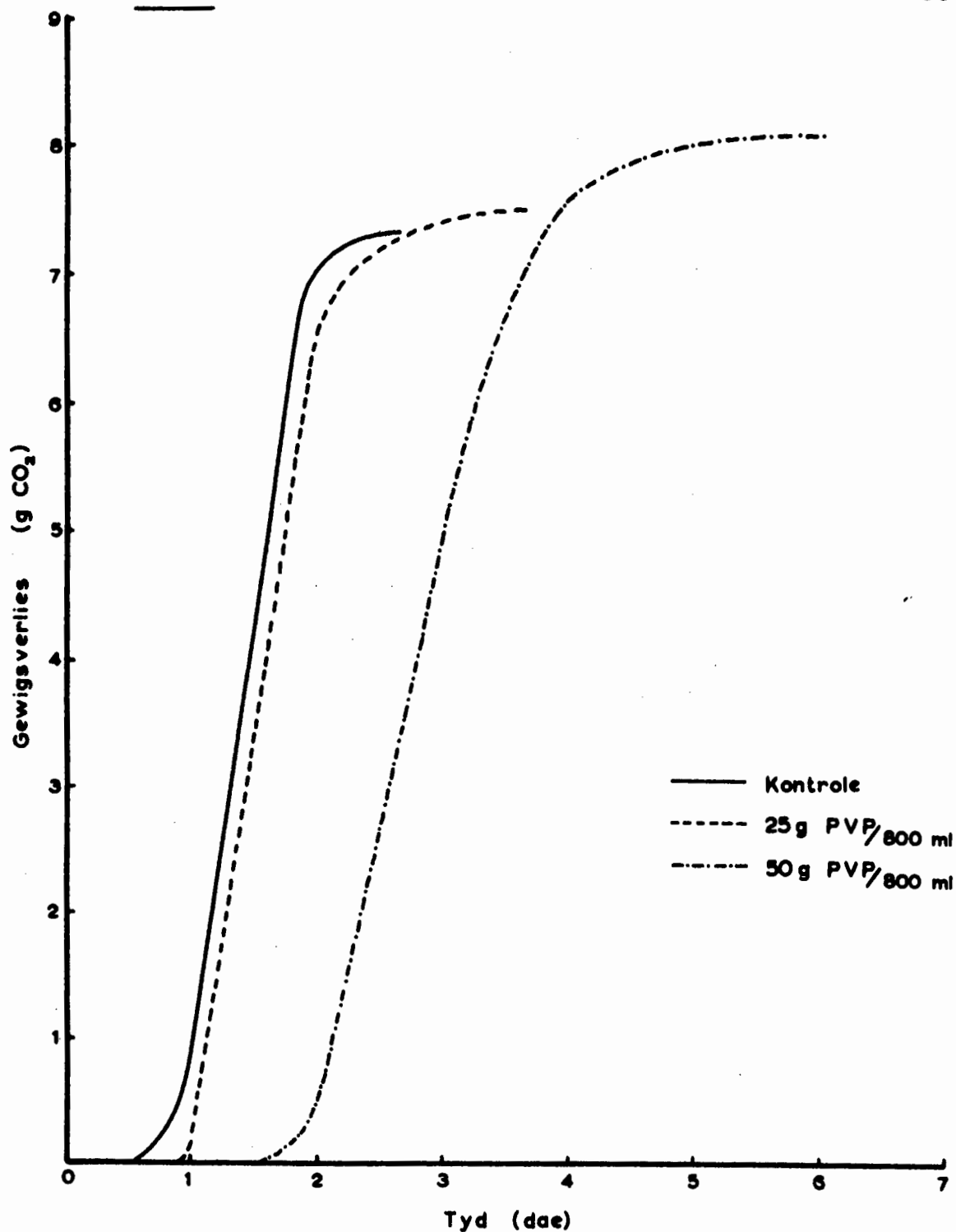
**FIG. 7**    **DIE INVLOED VAN PVP OP DIE HERGISTING VAN PONTAKWYN (c)**



**FIG. 8** DIE INVLOED VAN PVP OP DIE HERGISTING VAN PONTAKWYN (d)



**FIG. 9**    **DIE INVLOED VAN PVP OP DIE GISTING VAN STEEN PERSMOS**



TABEL 2. Suikergehaltes van Pontakwyne wat voor hergisting met PVP behandel is.

Behandeling	Suikergehalte (g glukose/100 ml)
Pontak (a) sonder PVP	0.10
" plus "	0.10
Pontak (b) sonder PVP	0.20
" plus "	0.22
Pontak (c) sonder PVP	0.20
" plus "	0.18
Pontak (d) sonder PVP	0.30
" plus "	0.25



TABEL 3.     Ontledingsdata van wyne berei uit  
PVP-behandelde persmos.

Mosbehandeling	Ballinglesing (°B)	Suikergehalte (g glukose/100 ml)	Totale fenolgehalte (g/l gallussuur)	Alkohol (vol. %)	Gliserol (g/l)
Onbehandelde Kontrole	+1.7	0.20	4.205	6.68	6.75
Behandel met 25g PVP/800 ml	+1.5	0.19	2.871	6.72	6.25
Behandel met 50g PVP/800 ml	+1.1	0.17	0.280	6.72	6.15

nie. Hiervan wil dit voorkom asof gewigsverlies aan koolsuurgas nie as 'n betroubare maatstaf van die volledigheid van gisting aanvaar kan word nie. Die hoë Ballinglesings van die wyne skep ook die indruk dat al die suiker nie uitgegis het nie. Die alkoholgehaltes van die wyne is egter besonder laag en verklaar die hoë neiging van die Ballinglesings. Die Ballinglesing van 'n wyn berus op die digtheid daarvan, wat deur beide die alkohol- en ekstrakgehalte bepaal word. Wyne met lae alkoholgehaltes sal gevolglik hoë Ballinglesings vertoon. In model waterige oplossings het 'n verskil van 2 persent (v/v) wat alkoholgehalte betref, 'n verskil van  $0.8^{\circ}$  Balling tussen twee oplossings veroorsaak. Die gliserolgehaltes is ook besonder laag, maar tog in korrekte verhouding tot alkoholgehalte, as in aanmerking geneem word dat die verhouding tussen alkohol- en gliserolvorming tydens gisting, naastenby konstant is (Rebelein, 1957). Die enigste verklaring vir die lae alkohol- en gliserolgehaltes is die aanwesigheid van onnatuurlike hoeveelhede water in die mos. Die onderlinge verskille in die Ballinglesings van die drie wyne, kan moontlik toegeskryf word aan groot verskille in konsentrasie fenoliese verbindings en tot 'n geringer mate, verskille in alkohol-, gliserol- en suikergehalte, asook gehalte aan ander ekstrakstowwe.

### 3.3 Die invloed van gefraksioneerde wynfenole op die gistingsnelheid en vermeerdering van gisselle.

Alhoewel fenoliese verbindings altyd in kombinasie met

ander ekstrakstowwe van doppe, pitte en stingels in 'n druifwemos voorkom, is dit noodsaaklik om van gesuiwerde druiffenole gebruik te maak ten einde onomwonde vas te stel of dié verbindings enig-sins direk met inhibisie van gisting in verband gebring kan word.

In Tabel 4 word die verskillende fraksies van wynfenole wat met behulp van chromatografiese skeidings verkry is, aangetoon. Die klassifikasie in groepe soos rooi polimere, kleurlose monomere ens., berus uitsluitlik op aannames na aanleiding van resultate wat in die literatuur beskryf is (2.2.4.3).

### 3.3.1 Invloed op gistingsnelheid.

In elkeen van ses proefbuise is 9 ml van die gekonsentreerde standaard gistingsmedium (2.2.5.1) gepipetteer. In die onderskeie proefbuise is ook 1 ml van 'n spesifieke fraksie wynfenole gepipetteer. 'n Kontrolemedium is berei deur 1 ml gedistilleerde water by 9 ml basiese medium te pipetteer. Die volume wyn waaruit die ses fraksies wynfenole oorspronklik geïsoleer is, was 100 ml. Die eluate is ingedamp tot 10 ml en 1 ml van laasgenoemde oplossings is weer in die basiese medium tot 10 ml verdun. Die verskillende gistingsmedia het dus 'n spesifieke fraksie wynfenole bevat teen dieselfde konsentrasie as wat dit in die oorspronklike wyn voorgekom het.

Die gistingsnelheid van gisrasse W.E. 1 en W.E. 14 in bogenoemde media is met behulp van 'n Warburg-apparaat bepaal.

Uit Tabel 5 blyk dat die gemiddelde gistingsnelheid van 'n gisras nie noemenswaardig van gistingsmedium tot gistingsmedium

TABEL 4. Fenolfraksies van wyne.

Fraksie	Vernaamste fenoliese verbindings teenwoordig
A	"Rooi monomere" geskei op Sephadex-kolom
B	"Rooi polimere" " " "
C	"Kleurlose monomere" " "
D	"Geel polimere" " " "
E	"Rooi monomere" geskei op poliamied-kolom
F	"Geel monomere" " " "

TABEL 5. Gemiddelde gistingsnelheid van twee gisrasse in gistingsmedia met verskillende fraksies wynfenole teenwoordig.

Fraksie wynfenole in gistingsmedium	Gem. gistingsnelheid (ml CO <sub>2</sub> /u/g gis)	
	W.E.1	W.E. 14
Kontrole	32.4	32.6
A	34.2	34.9
B	32.7	32.8
C	35.8	32.5
D	34.7	33.4
E	35.2	33.9
F	32.8	32.4

verskil nie. By beide gisrasse het die gisselle in die kontrole-medium in werklikheid van die laagste gemiddelde gistingsnelhede getoon. Wanneer die gistingsnelhede van die onderskeie gisrasse grafies as 'n funksie van volume vrygestelde koolsuurgas voorgestel word, blyk dit dat die kurwes vir die verskillende media vir alle praktiese doeleindes deur 'n enkele kurwe vervang kan word.

Dit wil dus voorkom asof die teenwoordigheid van die verskillende fraksies wynfenole in 'n sintetiese medium geensins die gistingsvermoë van die twee gisrasse nadelig beïnvloed het nie. Hierdie bevindings sluit egter nie die moontlikheid uit dat indien die verskillende fraksies verder gefraksioneer sou word, sommige individuele verbindings wel effens stremmend en ander weer effens stimulerend op gistingsnelheid kan inwerk nie (Sikovec, 1966).

### 3.3.2 Invloed op gisselvermeerdering.

Die invloed van die verskillende fraksies wynfenole op die groei van gisrasse W.E. 1, W.E. 14, W.E. 353 en die bakterie Bacillus subtilis is volgens die toetsskyfie-metode bepaal.

Geeneen van die fraksies kon die groei van enige van die gisrasse merkwaardig inhibeer nie. Daar is egter opgemerk dat toe die gisselkolonies net begin sigbaar word het, daar rondom al die toetsverbindings (behalwe fraksie C) 'n klein diffuse sone waarin geen gisselgroei plaasgevind het nie, sigbaar was. Hierdie sones het egter baie gou verdwyn deurdat die gisselkolonies later tot teenaan die toetsskyfies ontwikkel het. Dit kom dus



voor asof die fenoliese verbindings die aanvanklike groei van die gisselle ietwat kon vertraag het.

Alle fraksies wynfenole het tot 'n mindere of meerdere mate 'n inhiberende invloed op die groei van B. subtilis gehad. Tabel 6 toon die deursnitte van die helder sones rondom die skyfies waarop die verskillende fraksies aangebring was. Fraksies A en E het die sones met die grootste deursnit opgelewer. Hierdie twee fraksies is albei in soverre die klassifikasie in Tabel 4 korrek is, die rooi monomere van Pontakwyn. Die deursnit van die helder sones rondom die toetsskyfies met fraksies B, C, D en F is opmerklik kleiner met min onderlinge verskil.

### 3.4 Invloed van dop-en pitekstrakte op gisting, vermeerdering en fisiologiese toestand van gisselle.

Media met verskillende konsentrasies dop- en pitekstrakte is berei. Ongeveer 25 liter Steenmos (19<sup>0</sup>B) wat die minimum dopkontak gehad het, is gekonsentreer tot 10 liter deur die uitvriesing van water. Deur byvoeging van water en glukose is uiteindelik 11 liter mos met 'n suikergehalte van 40<sup>0</sup> Balling verkry. Hierdie gekonsentreerde mos is steriel filtreer en die verskillende media is daaruit opgemaak (sien Tabel 7). Aangesien die dopekstrak 8.7 g/100 ml suiker bevat het, is die suikergehaltes van die media met behulp van glukose almal na dieselfde peil verhoog. Omdat die dop- en pitekstrakte baie gekonsentreerde waterige oplossings was, was die ekstrakstowwe daarin, nie volkome opgelos nie. Die ekstrakte is gevolglik

TABEL 6. Deursnit van helder sones rondom  
toetsskyfies in B. subtilis  
kolonies.

Fraksie wynfenole op toetsskyfie	Deursnit van sone (cm)
Kontrole	0
A	2.6
B	1.0
C	1.3
D	0.9
E	3.2
F	1.2

TABEL 7. Samestelling van dop- en pit-  
ekstrak-bevattende media.

MEDIUM	INHOUD						ONTLEDING	
	Gekons. Mos (ml)	Dopekstrak (ml)	Pitekstrak (ml)	Gedist. Water (ml)	Glukose (g)	Glukose in Dopekstrak (g)	pH	Totale fenolgehalte (g/l gallussuur)
K	1400	0	0	1400	42.3	0	3.66	0.11
D1	1400	130	0	1270	31.0	11.3	3.69	0.49
D2	1400	486	0	914	0	42.3	3.67	1.75
DP3	1400	243	273	884	21.2	21.1	3.70	2.80
DP5	1400	486	408	456	0	42.3	3.72	4.42
P1	1400	0	137	1263	42.3	0	3.68	0.97
P3	1400	0	450	950	42.3	0	3.70	3.01

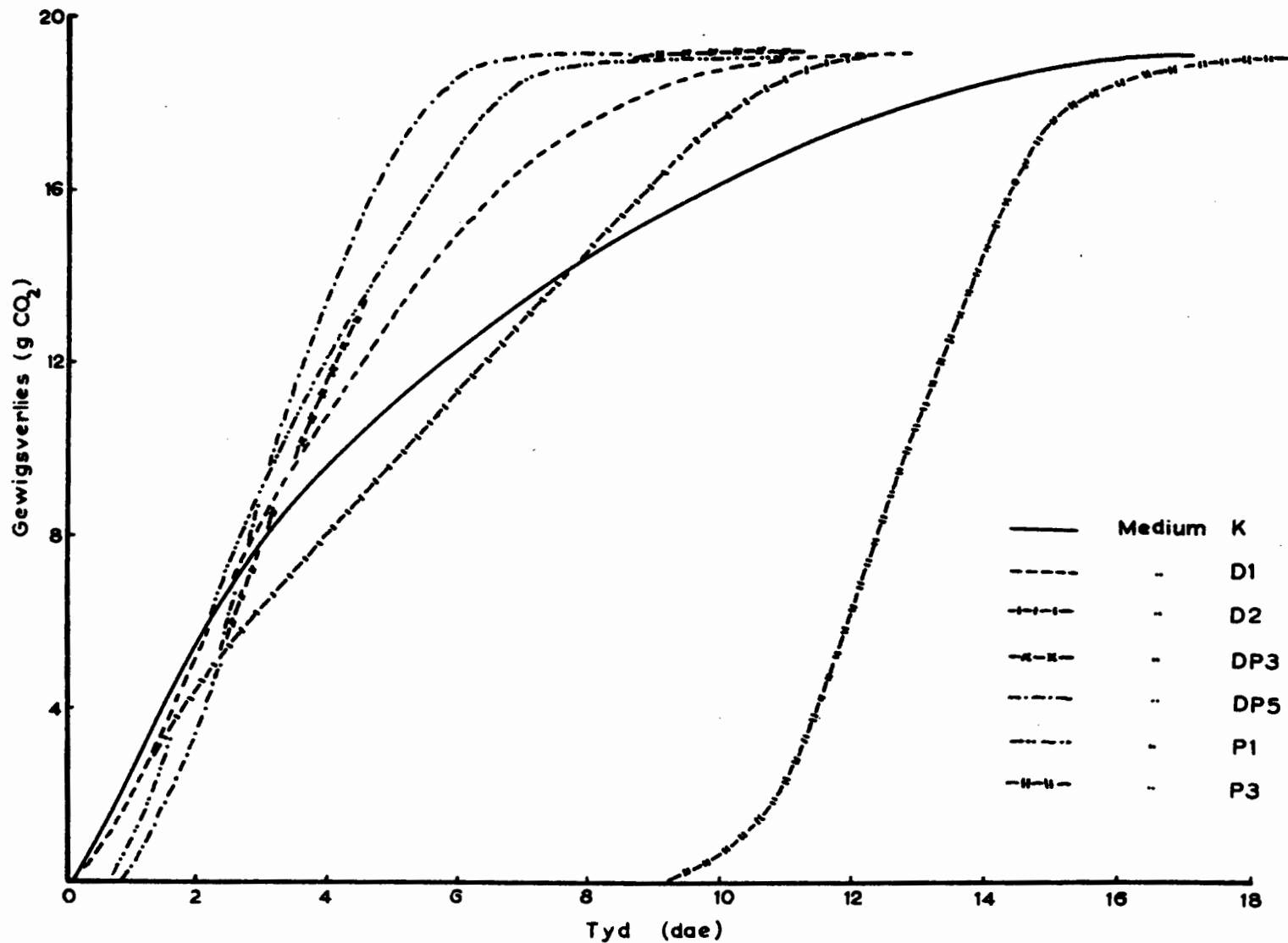
baie goed geskud voordat byvoegings daarvan by die verskillende media gemaak is. Na byvoeging tot die media en gevolglike verdunning, was geen onoplosbare deeltjies of presipitate sigbaar nie. Elke medium is in 200 ml hoeveelhede verdeel en onder stikstofgas by  $-10^{\circ}\text{C}$  bewaar. Wanneer benodig, is die media ontdooi en vir ongeveer een uur by  $30^{\circ}\text{C}$  gehou om enige verbindings wat weens die bevriesing uitgeskei het, weer op te los. Net voor gebruik is die media steriel filtreer.

#### 3.4.1 Invloed op verloop van gisting.

Van elkeen van die verskillende media is 200 ml hoeveelhede in gesteriliseerde gistingflesse gepipetteer. Elke monster is ingeënt met 1 ml van 'n suspensie van gisras W.E. 14. Deur die daaglikse gewig aan koolsuurgas te noteer, is gistingsturwes verkry. Na afloop van die gisting is die Ballinglesings en suikergehaltes van elke wyn bepaal.

Uit die gistingsturwes (Fig. 10) blyk dat die gisting in die kontrole medium tot en met die tweede dag vinniger was as in al die ander media. Die aanvang van gisting in media waar fenoliese verbindings teenwoordig was, was dus aanvanklik effens vertraag. Vanaf die tweede dag het daardie media egter veel hoër gistingstempo's as die kontrole gehad. Die kontrole het ongeveer 16 dae geneem om die suiker uit te gis, terwyl meeste van die ander media na ongeveer sewe dae klaar gegis het. Die begin van gisting in medium P3 is amper 10 dae vertraag, maar daarna was die gistingstempo hoog genoeg om gisting na sewe

**FIG. 10    DIE INVLOED VAN DOP-EN PITEKSTRAKTE OP DIE VERLOOP VAN GISTING**



dae te voltooi. Volgens die Ballinglesings en suikergehaltes van die sewe wyne in Tabel 8, blyk dit dat al die wyne droog gegis het.

Dit wil dus voorkom asof dop- en pitekstrakte na 'n aanvanklike vertraging van die gistingsproses, 'n sterk stimulerende invloed daarop kan hê.

#### 3.4.2 Invloed op fisiologiese toestand van gisselle.

Indien dieselfde gisselle gebruik word om meer as een gistingsproses in media ryk aan dop- en pitekstrakte teweeg te bring, word 'n verswakking in die gistingsvermoë van die gisselle verwag indien fenoliese verbindings aan die gisselwand geadsorbeer word.

Van elkeen van die onderskeie media is 600 ml in 'n 1 liter Erlenmeyerfles steriel filtreer. Elke fles is ingeënt met 2 ml van 'n suspensie van gisras W.E. 14. Die flesse is by 20°C gekubeer en daaglikse gewigsverlies is genoteer. Na verloop van vyf dae is 200 ml medium uit elke fles verwyder en vervang deur 200 ml vars medium met die ooreenstemmende samestelling. Hierdie prosedure is viermaal met tussenposes van vyf dae elk, herhaal. Aan die einde van die finale periode van vyf dae, is 1 ml uit elke medium getrek en gebruik om 400 ml vars medium van die ooreenstemmende samestelling, in te ent. Deurdat die aanvang van gisting in medium P3 eers na 14 dae ingetree het, is die gisselle daaruit direk na die eerste gistingsproses in vars medium P3 ingeënt, ten einde saam met die ander behandelings



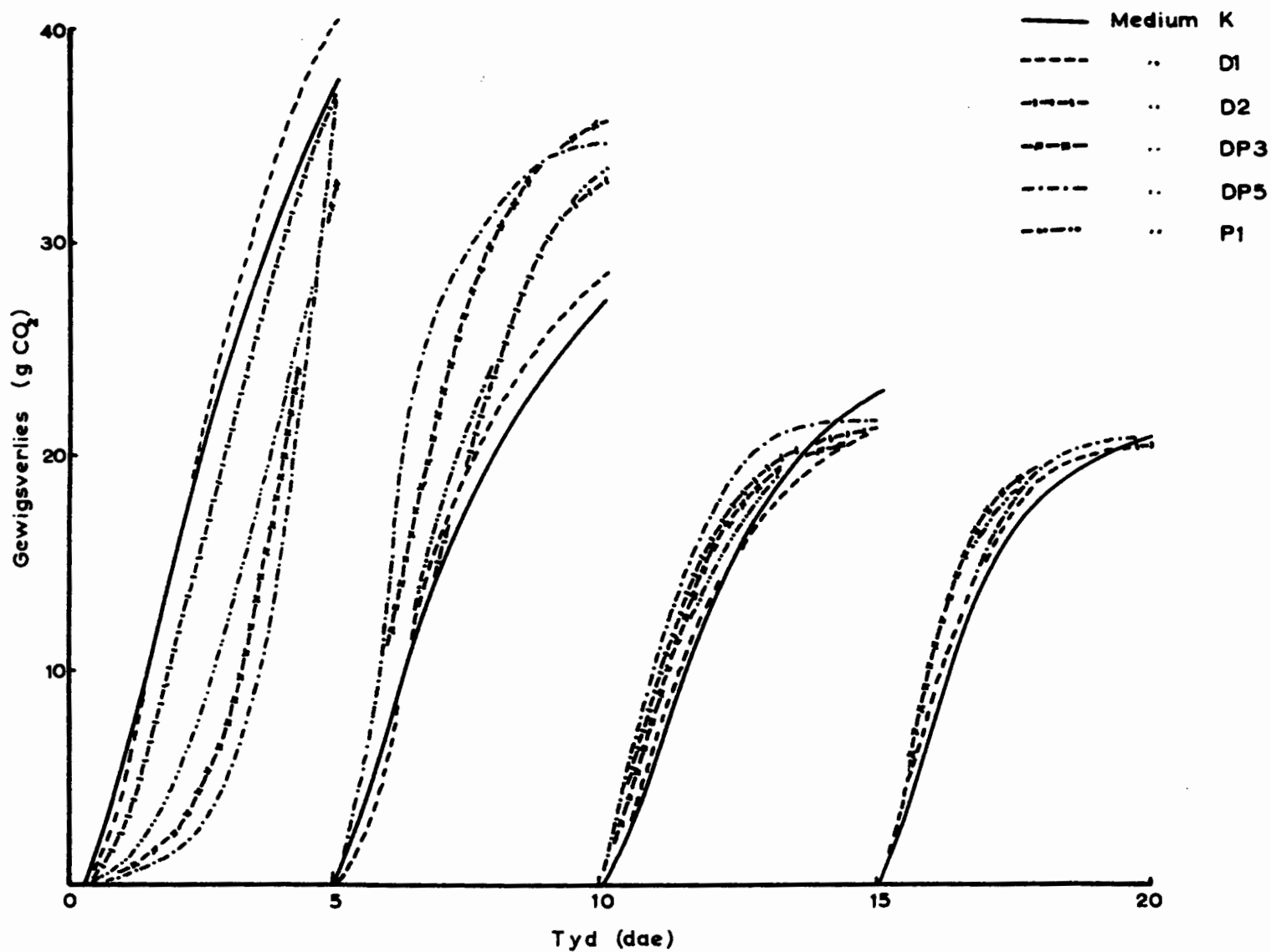
TABEL 8. Invloed van dop- en pitekstrakte in media, op die suikergehaltes van die wyne.

Wyn	Ballinglesing (°B)	Suikergehalte (g glukose/100 ml)
K	-2.3	0.10
D1	-2.3	0.10
D2	-2.2	0.12
DP3	-2.1	0.13
DP5	-1.9	0.13
P1	-2.3	0.11
P3	-2.0	0.13

gereed te wees vir Warburgstudies. Genoemde monsters is weer-  
eens by 20°C geïnkubeer en die verloop van gisting deur note-  
ring van daaglikse gewigsverlies, gevolg. Presies een dag na-  
dat geen verdere gewigsverlies waargeneem kon word nie, is die  
gisselle deur sentrifugering uit die onderskeie media herwin.  
Die groepe gisselle is vervolgens tweemaal met kalsiumchloried-  
oplossing (0.417 g/l) gewas voordat finale suspensies van onge-  
veer 0.2g nat gis per ml gemaak is. Vervolgens is die stikstof-  
gehaltes, asook die gemiddelde gistingsnelhede in die standaard-  
medium, van die verskillende groepe gisselle bepaal.

Fig. 11 toon die verloop van gisting in die verskillende  
media gedurende die vier periodes van vyf dae elk. Gedurende  
die eerste periode het die kontrolemedium saam met media D1 en  
D2 eerste begin gis en ook die grootste koolsuurgasverliese ge-  
toon. Gedurende die tweede periode het die kontrolemedium die  
laagste gistingstempo gehad en ook die minste koolsuurgas afge-  
gee. Gedurende die derde en vierde periodes was die verloop van  
gisting in die onderskeie media baie nader aan mekaar. Uit die  
afplatting van die gistingskurwes skyn dit asof die gisselle in  
die ekstrakbevattende media gedurende die laaste twee periodes  
elke keer die bygevoegde vars medium binne 'n periode van vyf  
dae droog gegis het. Die hellings van hierdie kurwes dui op die  
hoë gistingstempo's daarvan. In die geval van die kontrole-  
medium was die helling van die gistingskurwe deurgaans effens  
laer as dié van die ekstrakbevattende media, m.a.w. die gis-

FIG. 11 DIE INVLOED VAN HERHAALDELIKE TOEVOEGINGS VAN DOP-EN PITEKSTRAKTE OP GISTING

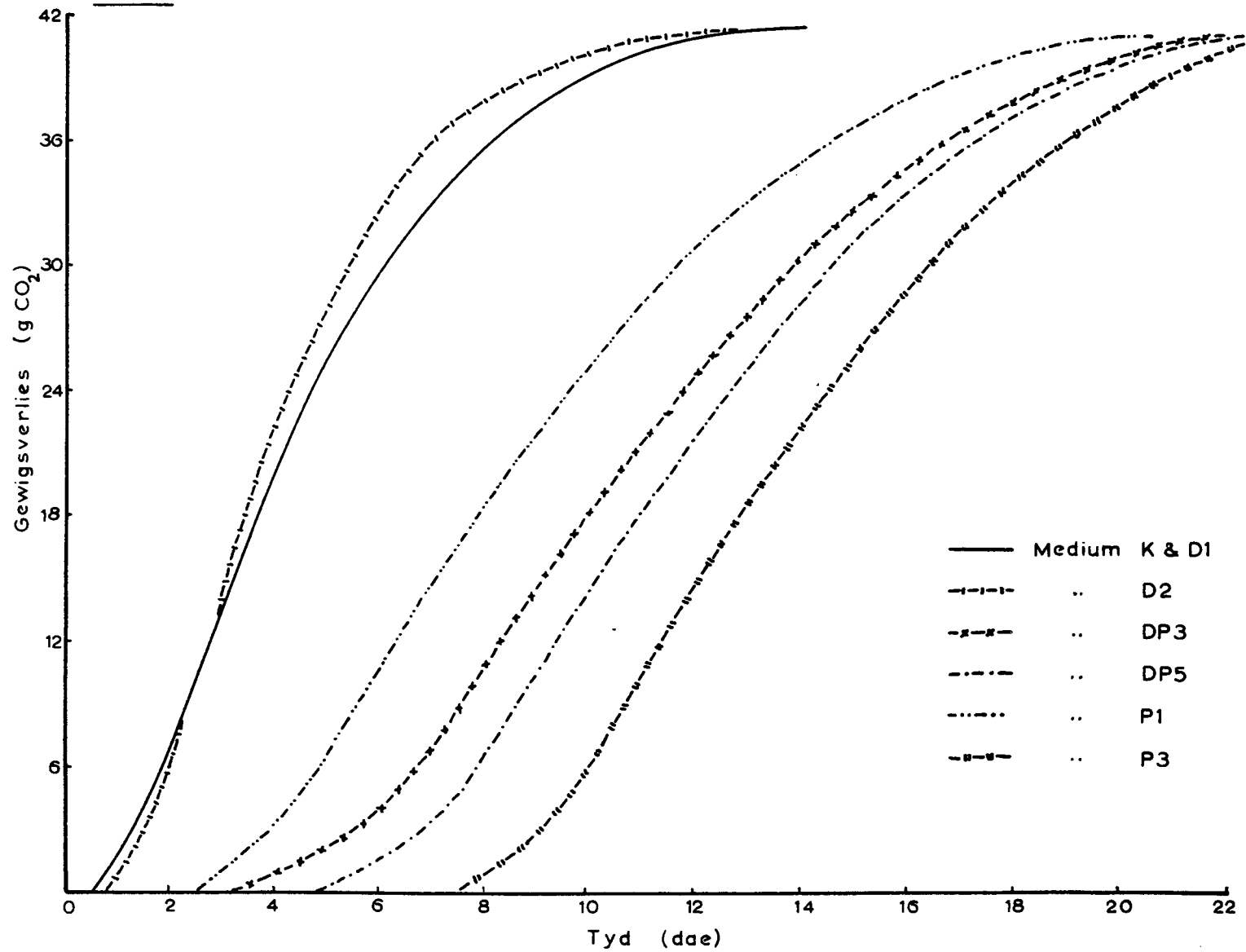


tingstempo was laer.

Tydens die finale gistingsperiode in die verskillende media, skyn dit dus asof die gistingsvermoë van die gisselle in die ekstrakbevattende media effens beter was as dié van die kontrole-medium. Uit Fig. 12 blyk dit egter dat waar gisselle uit daardie media gebruik is om ooreenstemmende vars media in te ent, die gisting in media DP3, DP5, P1 en P3 merkbaar swakker as in die kontrolemedium en media D1 en D2 was. Hierdie oënskynlik teenstrydige resultate is moeilik te verklaar. Dit wil egter voorkom asof die langdurige gisting in ekstrakbevattende media nie die werklike gistingsvermoë van die gisselle benadeel het nie, maar wel tog die vermoë tot selvermeerdering. So 'n afleiding verklaar dan tot 'n mate die vertraging in die intrede van gisting en die lae gistingtempo's in Fig. 12.

Tabel 9 toon die gemiddelde gistingsnelheid, stikstofgehalte en gistingsdoeltreffendheid van die verskillende groepe gisselle na afloop van die gistingsprosesse soos in Fig. 12 aangedui. Die gemiddelde gistingsnelheid van gisselle uit media P1 en P3 was effens laer as dié van die kontrole. Die klein verskille tussen die stikstofgehaltes en gistingsdoeltreffendhede van die onderskeie groepe gisselle dui nie onomwonde op 'n verswakking in die fisiologiese toestand van die gisselle deur dop- en pitekstrakte nie. Die verandering van gistingsnelheid met verloop van die gistingsprosesse in die onderskeie media, word in Fig. 13 aangedui. Hieruit blyk dat die gisselle uit die kontrolemedium en medium D1 aanvanklik die hoogste gistingsnelhede gehad het.

FIG. 12 DIE VERLOOP VAN GISTING NA LANGDURIGE KONTAK VAN GISSELLE MET DOP-EN PITEKSTRAKTE

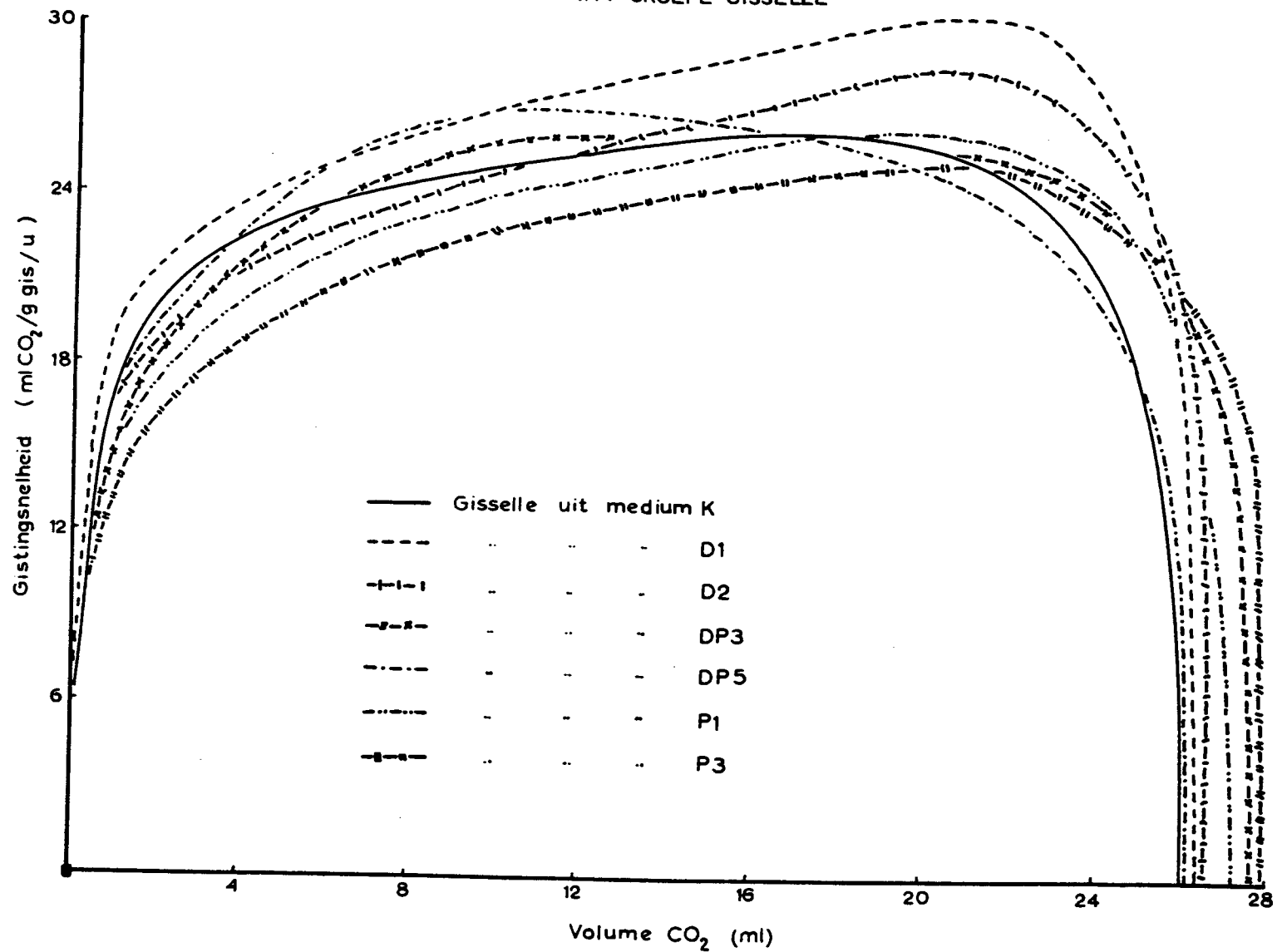


TABEL 9. Gemiddelde gistingsnelheid, stikstofgehalte en gistingsdoeltreffendheid van sewe groepe gisselle.

Oorsprong van Gisselle	Gem. gisting- snelheid ( $\bar{x}$ ) (ml CO <sub>2</sub> /u/g gis)	Stikstof- gehalte (%)	Gistingsdoel- treffendheid (K)
Medium K	24.0	1.50	16.0
" D1	25.5	1.56	16.4
" D2	23.5	1.56	15.1
" DP3	23.4	1.50	15.6
" DP5	24.1	1.46	16.4
" P1	22.9	1.50	15.3
" P3	21.6	1.47	14.7



FIG. 13 DIE INVLOED VAN LANGDURIGE KONTAK MET DOP- EN PITEKSTRAKTE OP GISTINGSNELHEID VAN GROEPE GISSELLE



Dit kan moontlik op 'n effens beter fisiologiese toestand daarvan dui. Die gisselle uit media D1 en D2 het 'n aanhoudende styging in gisting-snelheid getoon en het ook die hoogste gisting-snelhede van almal bereik. Die gisselle uit media DP3 en DP5 het in 'n redelike vroeë stadium 'n hoë gisting-snelheid bereik en daarna het dit geleidelik afgeneem. Oor die algemeen egter weerspieël die kurwes as 'n geheel, nie noemenswaardige nadelige effekte van dop- en pitekstrakte op gisselle nie.

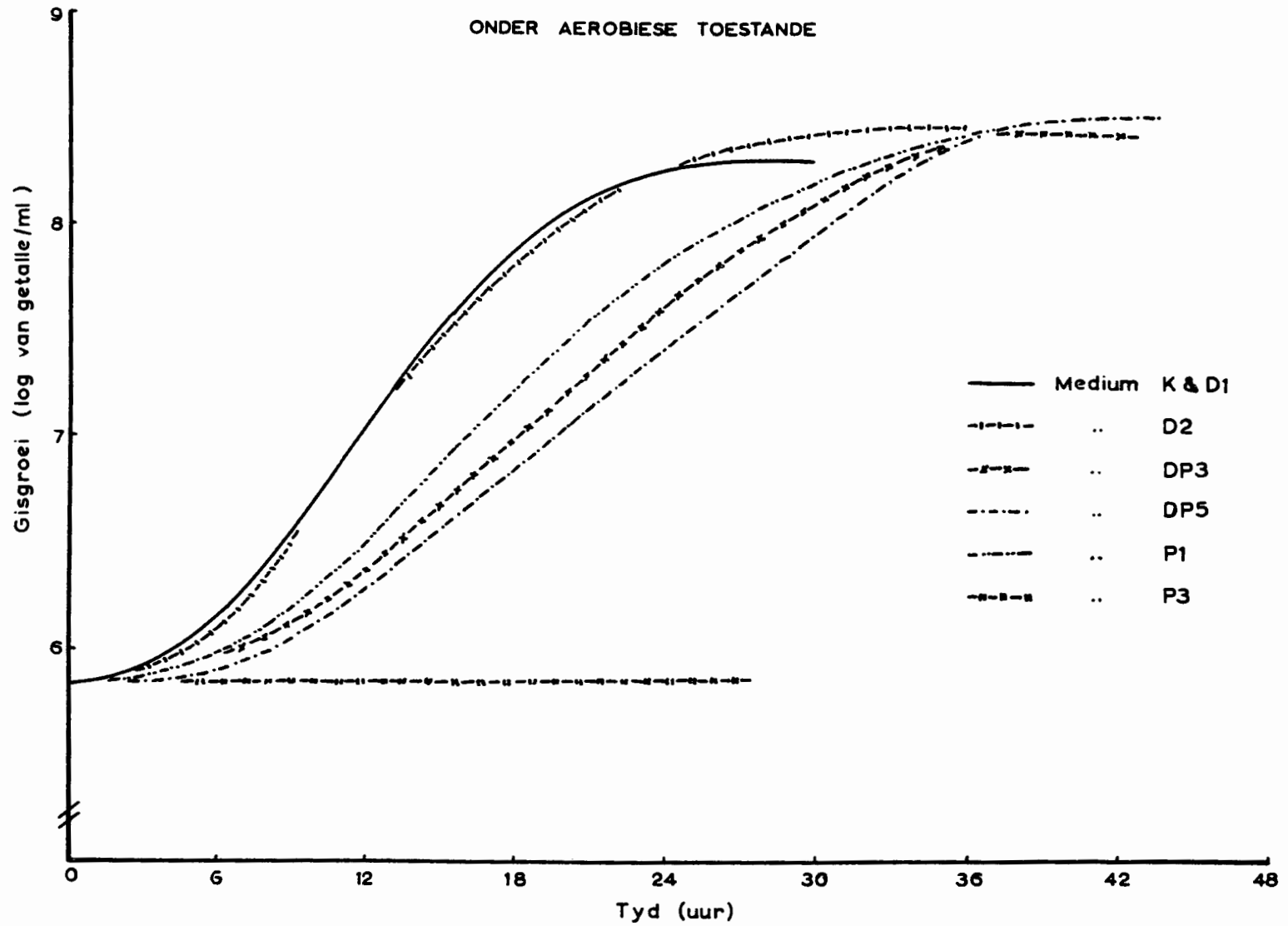
### 3.4.3 Invloed op gisselvermeerdering onder aerobiese toestande.

Uit die voorafgaande resultate het dit geskyn asof die intrede van gisting in media ryk aan dop- en pitekstrakte geïnhipeer is. Aangesien gisting nie kan intree voordat die gisselgetalle voldoende is nie, ontstaan die vermoede dat dop- en pitekstrakte die seldeling van giste kan inhibeer.

Derhalwe is die verloop van gisselvermeerdering onder aerobiese toestande in die ekstrakbevattende media ondersoek. Volgens Fig. 14 het geen selvermeerdering in medium P3 plaasgevind nie. Dit is in ooreenstemming met ander resultate wat daarop gedui het dat gisselle 'n lang aanpassingsperiode in hierdie medium vereis. Selvermeerdering in die kontrolemedium het vroeër begin en teen 'n hoër tempo plaasgevind as in die ander media. Die media wat pitekstrak bevat het, het heelwat laer groeitempo's as die media wat net dopekstrak bevat het, getoon. Teen die einde van die groeiperiode was die totale getal gis-

FIG. 14 DIE INVLOED VAN DOP-EN PITEKSTRAKTE OP GISSELVERMEERDERING

ONDER AEROBIESE TOESTANDE



selle in alle media behalwe medium D1, heelwat hoër as dié van die kontrolemedium. Die teenwoordigheid van dop- en veral pitekstrak het dus die sloerfase van seldeling verleng en die tempo van seldeling in die logaritmiëse groeifase verlaag, dog die totale opbrengs aan selle is daardeur verhoog.

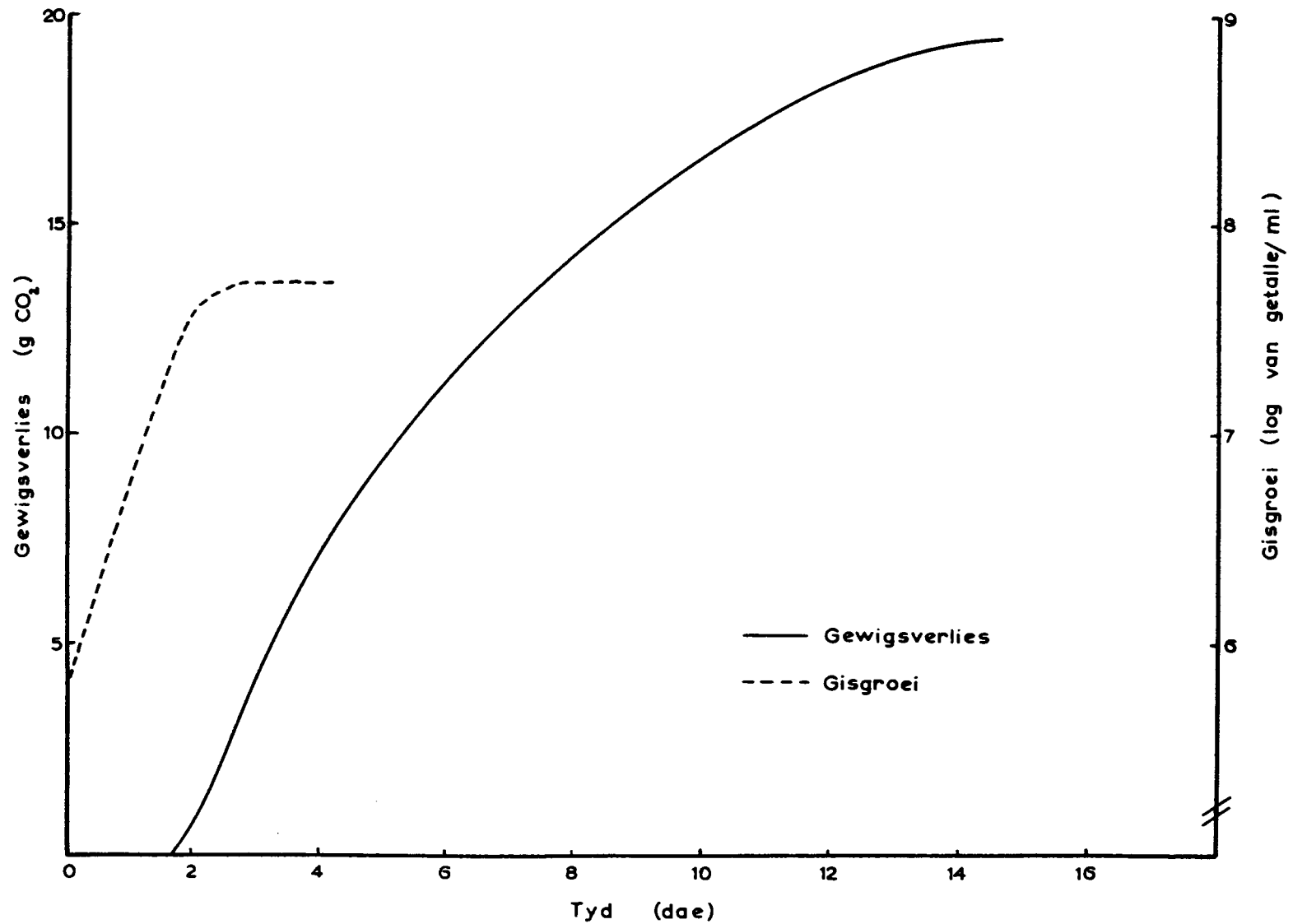
#### 3.4.4 Invloed op gisselvermeerdering onder anaerobiese toestande.

In die loop van die ondersoek is telkens waargeneem dat die teenwoordigheid van dop- en pitekstrakte in gistingsmedia tot verhoogde gismoervolumes aanleiding gee het. Laasgenoemde verskynsel kan moontlik toegeskryf word aan die feit dat die produksie van gisselmateriaal deur dop- en pitekstrakte gestimuleer word.

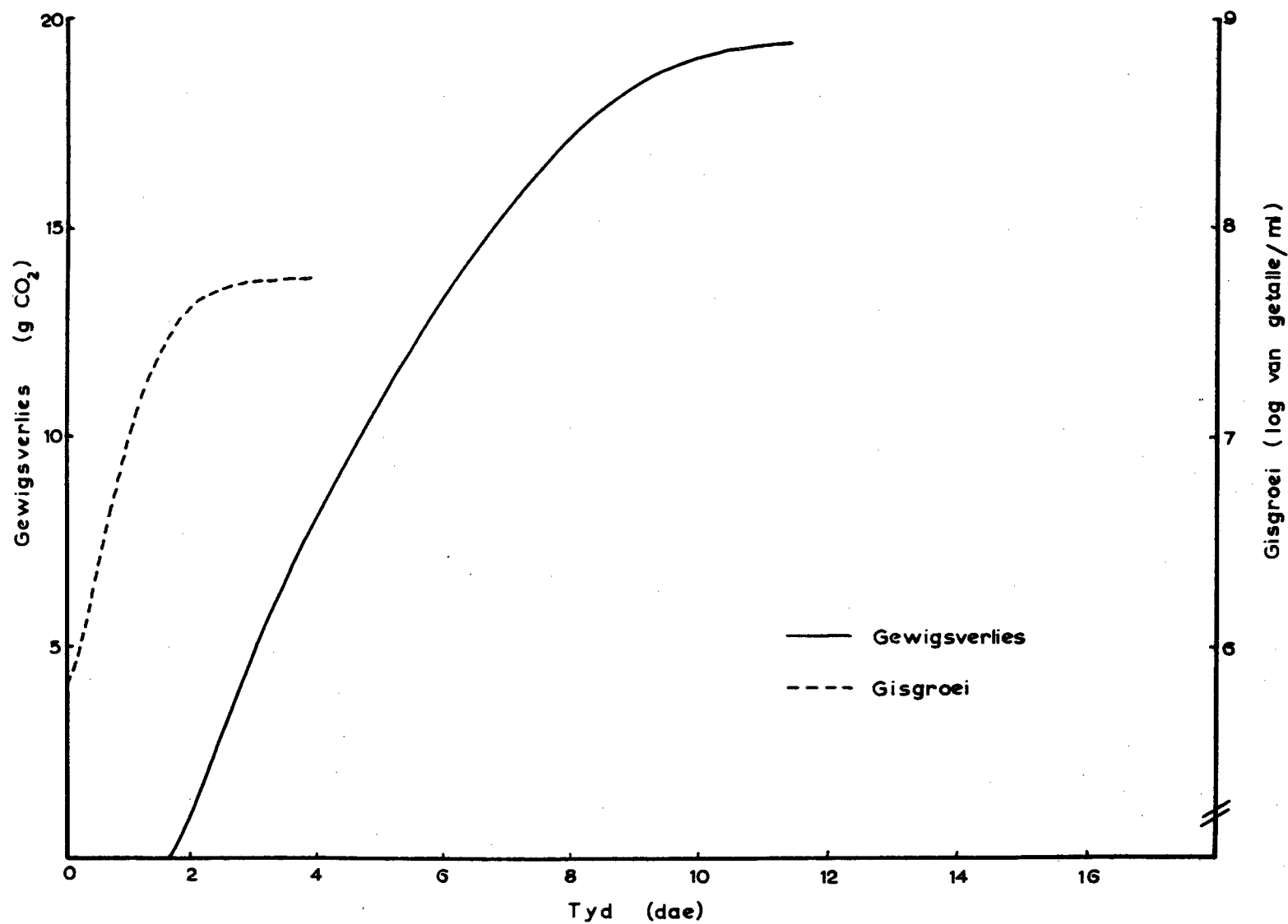
Die patroon wat selvermeerdering in verhouding tot gewigsverlies aan koolsuurgas in die verskillende media gevolg het, is ondersoek en word in Fig. 15 tot 21 weergegee.

Volgens Fig. 15 was selvermeerdering in die kontrolemedium feitlik volkome afgehandel teen die tyd dat gisting ingetree het. Dit is die normale verwagting, aangesien die medium anaerobies word kort nadat gisting ingetree het. Dit word algemeen aanvaar dat suurstof vir aktiewe gisselvermeerdering noodsaaklik is. By alle media waar dop- en pitekstrakte aanwesig was, volg selvermeerdering heeltemal 'n ander patroon. By die media waar veral pitekstrak teenwoordig was, het 'n aansienlike vertraging in selvermeerdering en gevolglik ook in gisting voorgekom. Na-

**FIG. 15** GISELVERMEERDERING TYDENS GISTING IN KONTROLE MEDIUM (MEDIUM K)

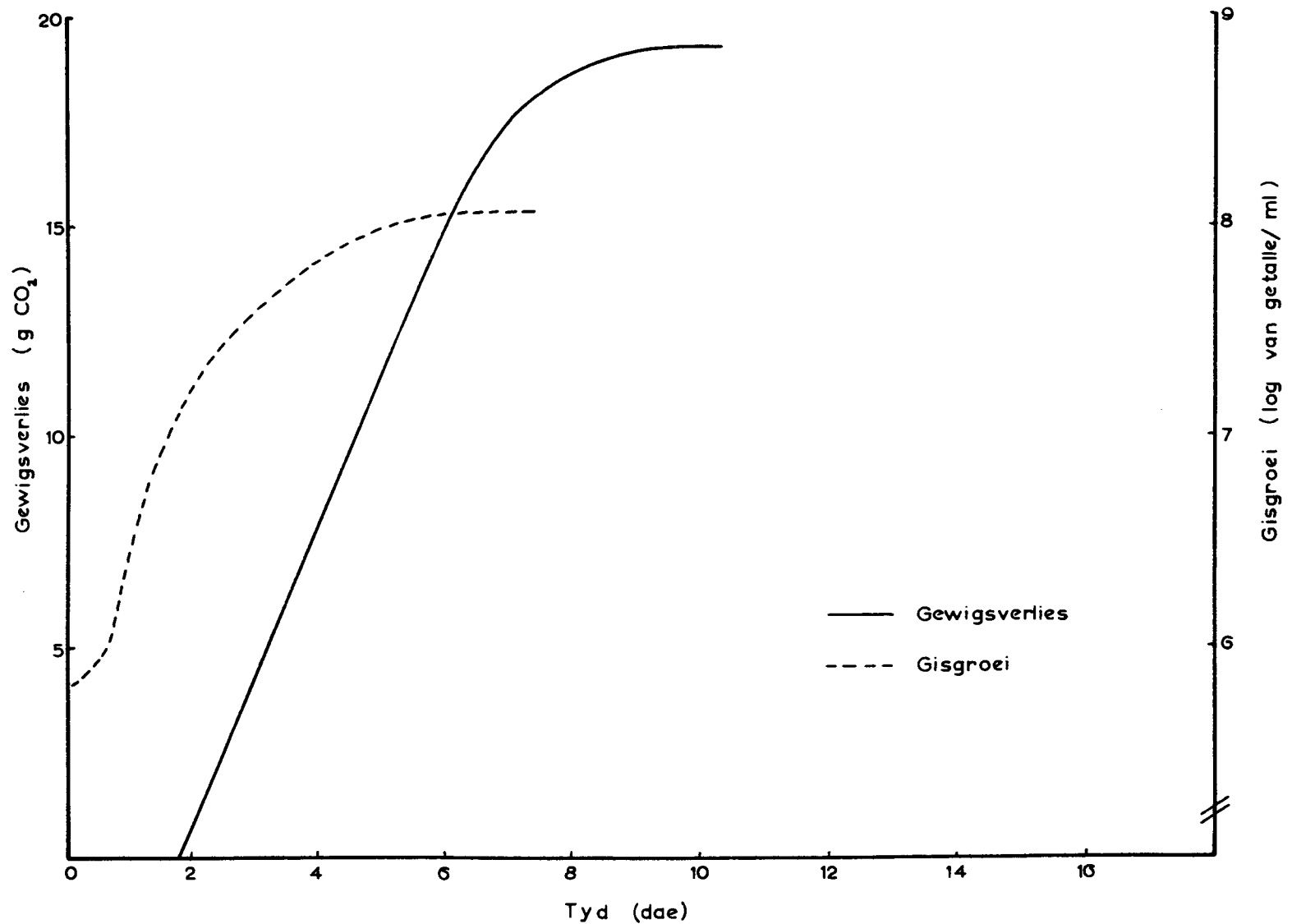


**FIG. 16** DIE INVLOED VAN DOPEKSTRAK (MEDIUM D1) OP GISSELVERMEERDERING TYDENS GISTING





**FIG. 17** DIE INVLOED VAN DOPEKSTRAK (MEDIUM D2) OP GISSELVORMERING TYDENS GISTING



**FIG. 18** DIE INVLOED VAN DOPEKSTRAK EN PITEKSTRAK (MEDIUM DP3) OP GISSELVERMEERDERING

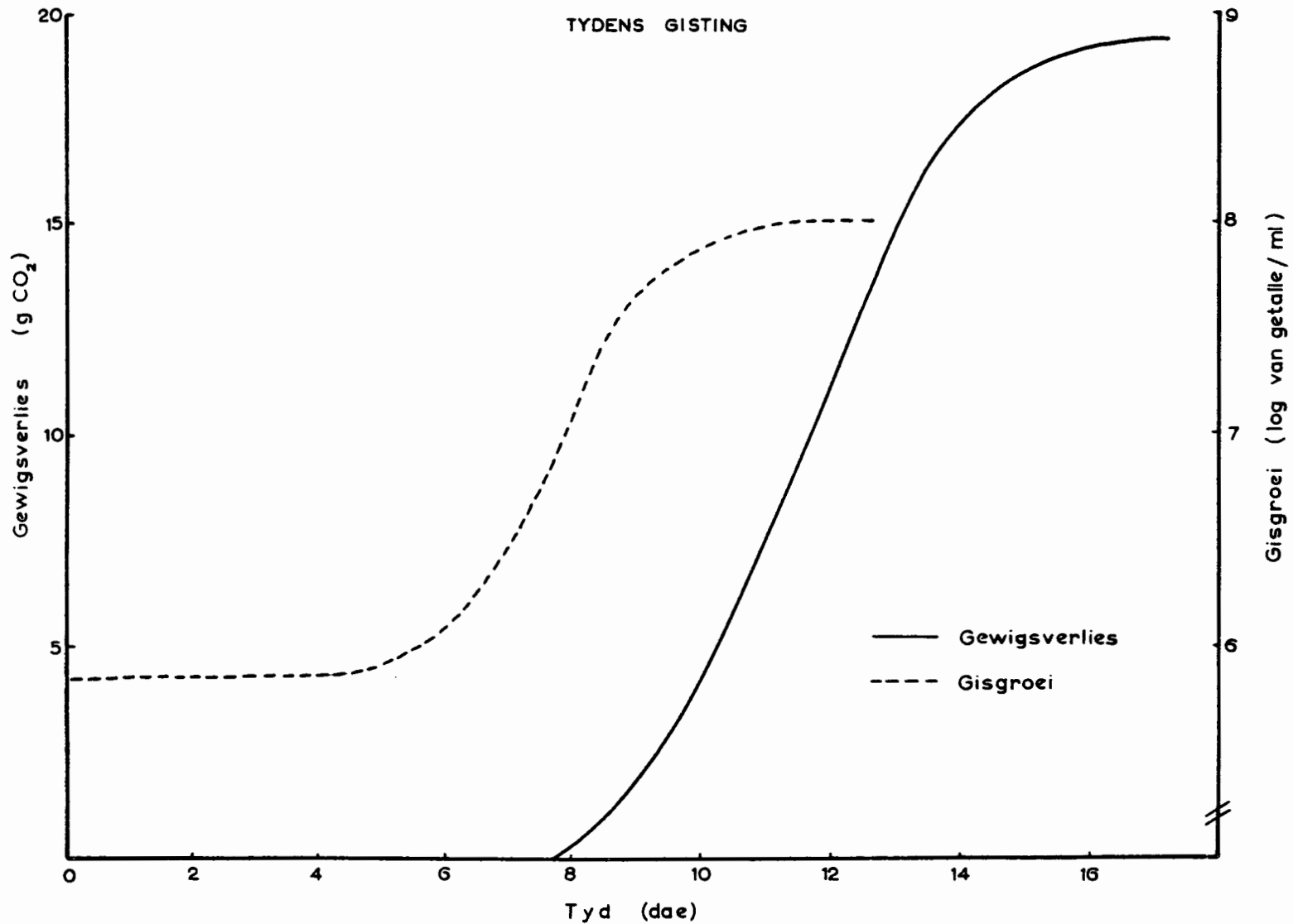
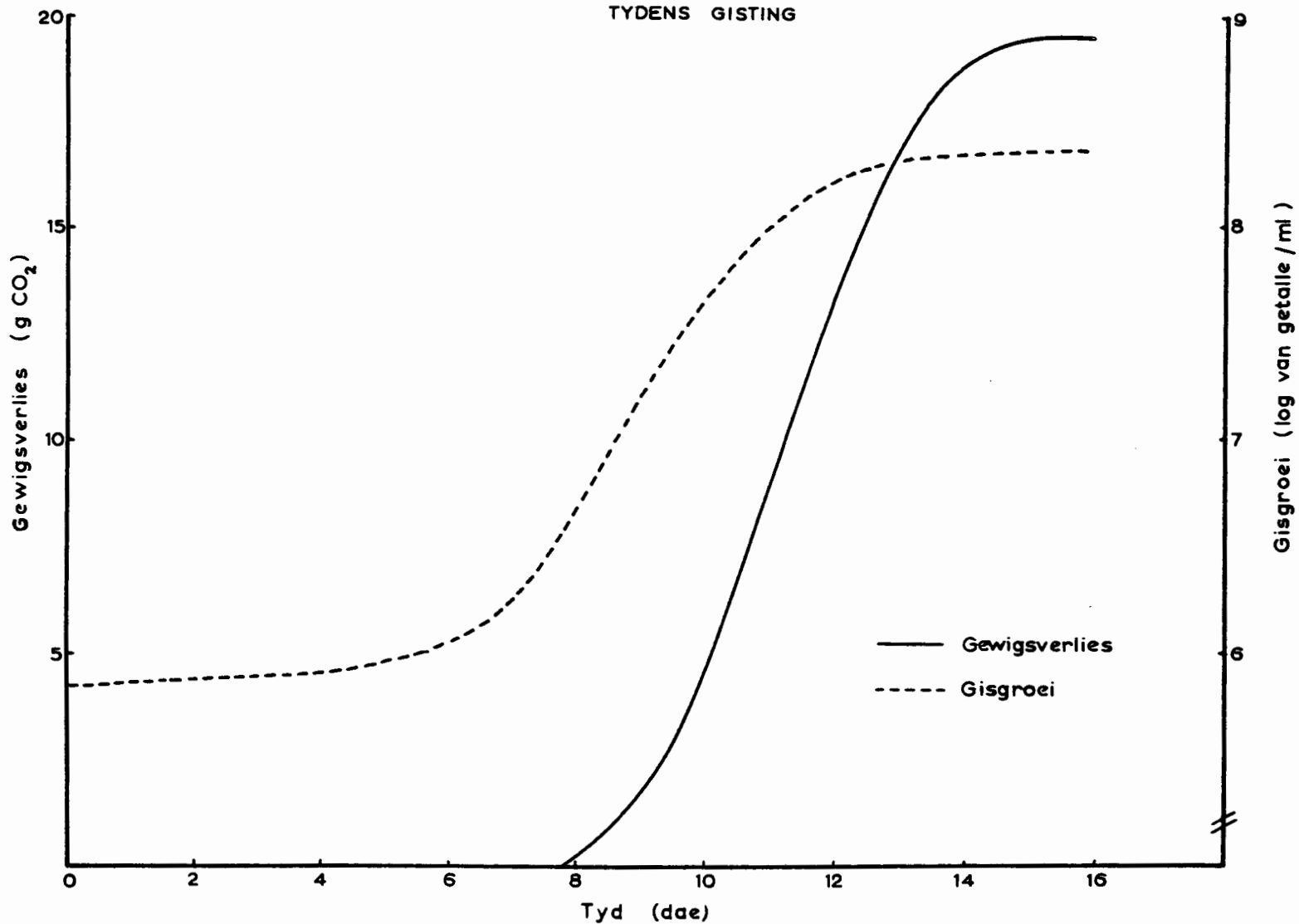


FIG. 19 DIE INVLOED VAN DOPEKSTRAK EN PITEKSTRAK (MEDIUM DP5) OP GISSELVVERMEERDERING

TYDENS GISTING



**FIG. 20**

**DIE INVLOED VAN PITEKSTRAK (MEDIUM P1) OP GISSELVERMEERDERING TYDENS GISTING**

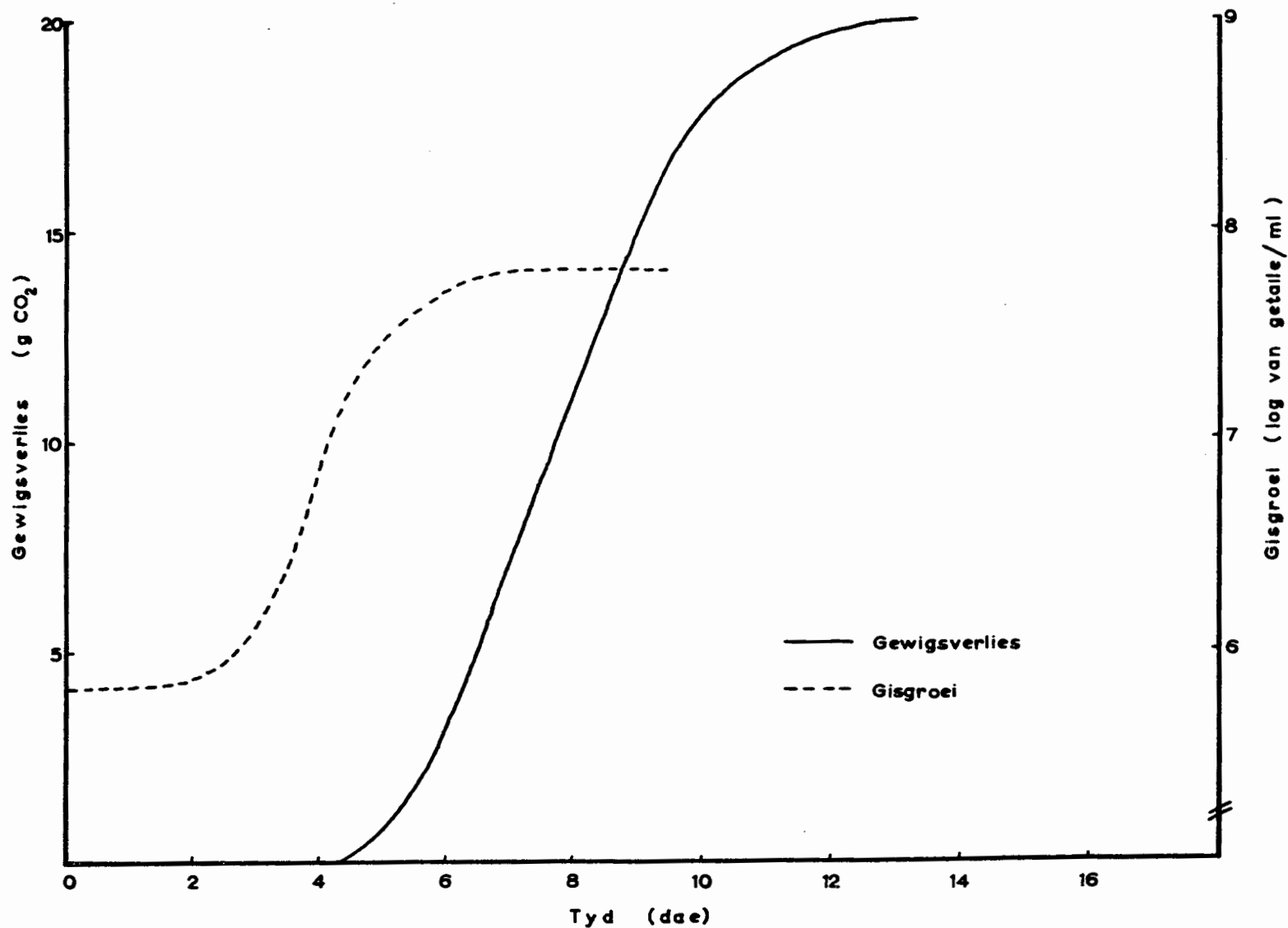
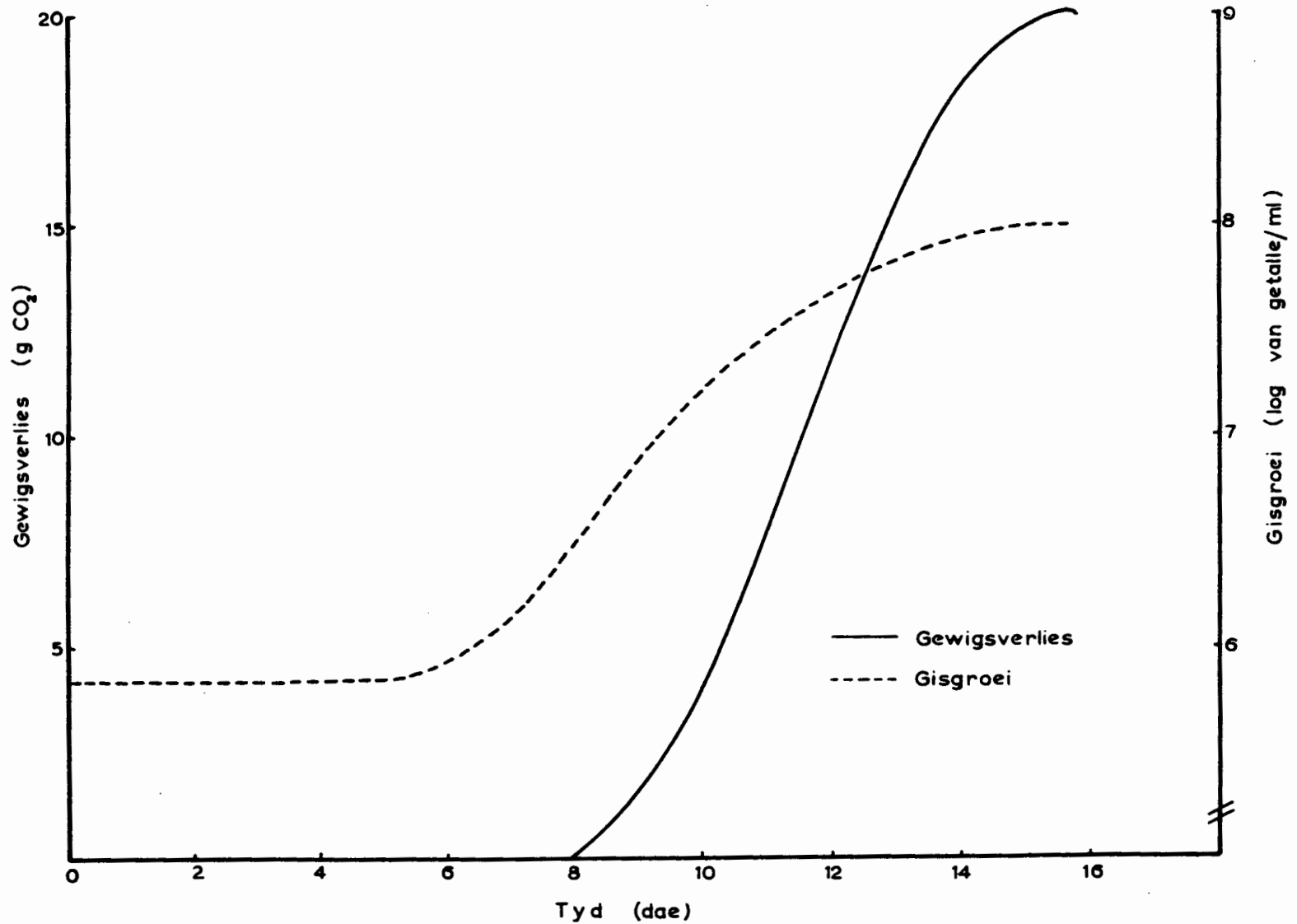


FIG. 21 DIE INVLOED VAN PITEKSTRAK (MEDIUM P3) OP GISSELVERMEERDERING TYDENS GISTING



dat daar genoeg gisselle gevorm was, sodat die gistingsproses kon intree en die media dus anaerobies geword het, het selvermeerdering nie soos by die kontrolemedium tot stilstand gekom nie. Die aktiewe selvermeerdering onder anaerobiese toestande het tot gevolg gehad dat die gistingsproses baie vinnig verloop het. Die totale getal gisselle aan die einde van die gisting was ook heelwat hoër by die media met dop- en pitekstrakte as by die kontrolemedium.

Die verskynsel dat fenoliese verbindings skynbaar die anaerobiese selvermeerdering van giste kan stimuleer, skep die indruk dat genoemde verbindings tot 'n mate die rol van suurstof kan vervul. Die moontlikheid is nie uitgesluit dat gedeeltelik geoksideerde fenoliese verbindings kan optree as reduseerbare waterstofakseptors in die respiratoriese ensiemsisteem nie. Indien 'n gedeelte van die beskikbare suiker onder anaerobiese toestande deur die sitroensuur-siklus geoksideer kan word, kan sodoende meer energie vir aktiewe selvermeerdering verkry word. Dit is bekend dat die oksidasie van glukose deur die Embden-Meyerhof-Parnas metaboliese roete, wat hoofsaaklik onder die anaerobiese toestande van gisting gevolg word, nie genoeg energie vir groot-skaalse gisselvermeerdering kan verskaf nie.

## HOOFSTUK 4

### GEVOLGTREKKINGS

In die bereiding van wyne vanaf verskillende cultivars, kon die teenwoordigheid van selfs abnormaal hoë konsentrasies fenoliese verbindings nie verhoed dat die gisselle alle beskikbare suiker uitgis nie.

Alhoewel daar nie genoegsame resultate is om 'n algemene gevolgtrekking te maak nie, skyn dit asof 'n hoë konsentrasie fenoliese verbindings die vorming van gliserol tydens die gistingproses effens stimuleer.

Geen bewys vir die ontstaan van toksiese fenoliese verbindings tydens gisting, kon gevind word nie.

Die teenwoordigheid van verskillende fraksies redelik suiwer wynfenole het geen nadelige invloed op die gistingsnelheid van twee reingisrasse gehad nie. Inteendeel, sommige fraksies het 'n verhoogde gistingsnelheid tot gevolg gehad.

Langdurige gisting in media ryk aan dop- en pitekstrakte, het nie 'n noemenswaardige nadelige invloed op die fisiologiese toestand van gisselle gehad nie.

Klaarblyklik is druiffenole in die algemeen en dié van pitte in die besonder, daartoe instaat om die begin van gisselvermeerdering te inhibeer. Sodra die gisselle egter aangepas is, word die totale produksie van gisselle gestimuleer.

Volgens die resultate van hierdie ondersoek wil dit voor-



kom asof die fenoliese verbindings wat normaalweg in druiwe voorkom, nie die gisselle sodanig kan strem dat alle beskikbare suiker nie uitgis nie. Dit moet egter daarop gewys word dat alle proewe in hierdie ondersoek met geselekteerde reingisrasse wat in die Suid-Afrikaanse wynbedryf gebruik word, uitgevoer is. Hierdie giste is almal rasse van Saccharomyces cerevisiae wat al baie jare teenoor die natuurlike bestanddele in druiwemos aangepas is. Die moontlikheid is dus nie uitgesluit nie dat onaangepaste giste van hetsy ander species, genera of families, wel sterker inhiberende effekte kon getoon het.

LITERATUURVERWYSINGS

- AMERINE, M.A., 1955. Laboratory procedures for enologists, Davis, California : Univ. of Calif. Press (Mimeo).
- AMRINE, M.A., BERG, H.W. & CRUESS, W.V., 1967. The technology of wine making, 2nd ed. Westport, Connecticut : The Avi Publishing Co.
- A.O.A.C., 1965. Official methods of analysis of the Association of Official Agricultural Chemists, 10th ed. Edited by W. Horwitz, Washington D.C. : A.O.A.C.
- BOSER, H., 1961. Modellversuche zur beeinflussung des zellstoffwechsels durch pflanzeneinhaltsstoffe, insbesondere flavonoide. *Planta Medica* 9, 456 - 465.
- CASSELL, E.A., 1965. Rapid graphical method for estimating the precision of direct microscopic counting data. *Appl. Microbiol.* 13, 293 - 296.
- CHANDLER, B.V. & HARPER, K.A., 1962. A procedure for the absolute identification of anthocyanins. *Austr. J. of Chem.* 15, 114 - 120.
- CHANDLER, B.V. & SWAIN, T., 1959. Separation of anthocyanins from plant extracts. *Nature.* 183, 989.
- COLE, M., 1958. Oxidation products of leuco-anthocyanins as inhibitors of fungal poly galacturonase in rotting apple fruit. *Nature.* 181, 1596 - 1597.
- DADAK, V., 1967. Wirkung natürlicher cumarine auf das Wachstum, die Atmung und Phosphorylierung von Hefen. *Die Pharmazie.* 22, 47 - 50.

- DITTRICH, H.H. & KERNER, E., 1966. Über die garhemmende Wirkung der Alkylester der Gallussäure. Z. Lebensm. - Untersuch. Forsch. 129, 364 - 369.
- DU PLESSIS, C.S. & DE WET, P., 1968. Browning in white wines. I. Time and temperature effects upon tannin and leuco-anthocyanidin uptake by musts from seeds and husks. S. Afr. J. Agric. Sci. 11, 459 - 468.
- FLANZY, M., 1935. Sur une cause d'arret de la fermentation alcoolique dans la vinification en rouge des raisins colares nouvelles regles de vinification et d' egrappage. Rev. Viticult. 83, 217 - 222.
- GOLDMAN, M., 1963. Factors influencing the rate of carbon dioxide formation in fermented-in-the-bottle champagne. Am. J. Enol. Vitic. 14, 36 - 42.
- HASLAM, E., 1966. Chemistry of vegetable tannins. London : Academic Press.
- HENNIG, K. & BURKHARDT, R., 1958. Der Nachweis phenolartiger Verbindungen und hydroaromatischer Oxycarbonsäure in Traubenbestandteilen, Wein und weinähnlichen Getränken. Weinberg Keller 5, 542 - 552, 593 - 600.
- HULME, A.C. & JONES, J.D., 1963. Tannin inhibition of plant mitochondria. Ch. 10 in : Enzyme chemistry of phenolic compounds. Edited by J.B. Pridham, London : Pergamon Press Ltd.
- JOUBERT, D.J. 1948. 'n Morfologiese en fisiologiese studie van agt Suid-Afrikaanse gisrasse. M.Sc.(Agric.) - verhandeling. Univ. Stellenbosch.
- LÜTHI, H., 1957. Ueber die Ursachen unvollständiger Vergärung von Obstweinen. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 48, 201 - 217.

- MALAN, H., 1963. Flavonoids of black grape varieties grown in South Africa. M.Sc. (Agric.) - verhandelung. Univ. Stellenbosch.
- MANUAL OF MICROBIOLOGICAL METHODS, 1957. Soc. Amer. Bacteriologists. New York : McGraw-Hill Book Co.
- NEISH, A.C. 1952. Analytical methods for bacterial fermentations. 2nd Rev. National Res. Council of Canada, N.R.C. No. 2952.
- NEU, R., 1958. Separation of chalcones, flavanones and flavonols by chromatography with polyamid. Nature. 182, 660.
- NORD, F.F. & WEISS, S., 1958. Fermentation and respiration. Ch. 7 in : Chemistry and biology of yeasts. Edited by A.H. Cook, New York : Academic Press.
- POWERS, J.J.D., SOMAATMADJA, D., PRATT, D.E. & HAMDY, M.K., 1960. Anthocyanins. II. Action of anthocyanin pigments and related compounds on the growth of certain micro organisms. Food Technol. 14, 626 - 632.
- REBELEIN, H., 1957. Zur chemisch-analytischen Erkennung gezuckerter und gespritzter Weine. Dt. Weinztg. 93, 291 - 293.
- SCHANDERL, H., 1959. Handbuch der Kellerwirtschaft II, Die Mikrobiologie des Mostes und Weines, 2 Aufl. Stuttgart : Eugen Ulmer.
- SCHANDERL, H., 1962. Der Einfluss van Polyphenolen und Gerbstoffen auf die Physiologie der Weinhefe und der Wert des pH-7 Testes für die Auswahl von Sektgrundweinen. Mitt. (Klosterneuberg) 12A, 265 - 274.

- SIKOVEC, S., 1966a. Der Einfluss einiger Polyphenolen auf die Physiologie von Weinhefen. I. Der Einfluss von Polyphenolen auf die Verlauf der Alkoholischen Gärung insbesondere von Umgärung. Mitt (Klosterneuberg) 16, 127-138.
- SIKOVEC, S., 1966b. Der Einfluss einiger Polyphenolen auf die Physiologie von Weinhefen. II. Der Einfluss von Polyphenolen auf die Vermehrung und Atmung von Hefen. Mitt. (Klosterneuberg) 16, 272 - 281.
- SINGLETON, V.L. & DRAPER, D.E., 1964. The transfer of polyphenolic compounds from grape seeds into wine. Am. J. Enol. Vitic. 15, 34 - 40.
- SINGLETON, V.L. & ROSSI, J.A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. Am. J. Enol. Vitic. 16, 144 - 158.
- SINGLETON, V.L. & ESAU, P., 1969. Phenolic substances in grapes and wine, and their significance. Suppl. 1 to Advan. Food Res. New York : Academic Press.
- SOMERS, T.C., 1966. Wine tannins - isolation of condensed flavonoid pigments by gel-filtration. Nature. 209, 368 - 370.
- THORNE, R.S.W., 1954a. Fermentation velocity of yeasts. I. Measurement of fermentation velocity and the effects of experimental conditions. J. Inst. Brew. 60, 227 - 237.
- THORNE, R.S.W., 1954b. Fermentation velocity of yeasts. II. A study of the fermentation velocities of a series of bottom and top fermentation brewery yeasts. J. Inst. Brew. 60, 238 - 249.

- THORNE, R.S.W., 1958. Statistical survey of the fermentation efficiencies of a large number of strains of brewery yeasts and a consideration of the utility of these efficiencies in classification. J. Inst. Brew. 64, 411 - 421.
- VENTER, P.J. 1955. Die ontstaan en voorkoms van gliserien by die gisting van druiwemos. M.Sc. (Agric.) - verhandeling. Univ. Stellenbosch.
- VUATAZ, L., BRANDENBERGER, H. & EGLI, R.H., 1959. Plant phenol. Separation of the tea leaf polyphenols by cellulose column chromatography. J. Chromatog. 2, 173 - 187.
- VUATAZ, L. & BRANDENBERGER, H., 1961. Plant phenols. III. Separation of fermented and black tea polyphenols by cellulose column chromatography. J. Chromatog. 5, 17 - 31.
- WILLIAMS, A.H., 1963. Enzyme inhibition by phenolic compounds. Ch. 9 in : Enzyme chemistry of phenolic compounds. Edited by J.B. Pridham, London : Pergamon Press Ltd.
-